UNIVERSITE DE LAUSANNE – FACULTE DES SCIENCES
Institut de biologie et de physiologie végétales
Directeur : Professeur P.E. Pilet

ACIDES AMINÉS et CROISSANCE RACINAIRE

Thèse

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Lausanne
en vue de l'obtention du grade de docteur ès sciences
par

ERNST KELLER

LAUSANNE
1976
imprimé par
Technicon International Division S.A. Genève

UNIVERSITE DE LAUSANNE – FACULTE DES SCIENCES
Institut de biologie et de physiologie végétales
Directeur : Professeur P.E. Pilet

ACIDES AMINÉS et CROISSANCE RACINAIRE

Thèse

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Lausanne
en vue de l'obtention du grade de docteur ès sciences
par

ERNST KELLER

LAUSANNE
1976

imprimé par
Technicon International Division S.A. Genève

Imprimatur

Université de Lausanne
Faculté des Sciences

Vu le rapport présenté par le jury d'examen, composé de
MM les Professeurs Paul-Emile Pilet, directeur de thèse, Jörg Frei, expert, et Georges Brunisholz, président du jury

le Conseil de Faculté autorise l'impression de la thèse de
M. Ernst Keller, ingénieur chimiste et des industries agricoles, Louvain
intitulée "Acides aminés et croissance racinaire"

Lausanne, le 16 mars 1976

pour *Le doyen de la Faculté des Sciences:*
Georges Brunisholz, vice-doyen

UNIV. LEIDEN BIBL.

AVANT - PROPOS

C'est en 1968 que je fus engagé en tant qu'ingénieur agro-chimiste belge par la firme Technicon. Peu de temps après, j'espérais pouvoir commencer un travail de recherche chez le Professeur P.E. Pilet, directeur de l'Institut de biologie et physiologie végétales de Lausanne, dont les nombreux travaux sur les phytohormones de croissance avaient suscité mon intérêt.

Monsieur G. Charlap, Président de Technicon, acquiesça le projet et m'encouragea à entreprendre cette recherche sur la base d'une collaboration entre la firme et l'université. Monsieur le Professeur P.E. Pilet fut très ouvert à cette forme de recherche et accepta de diriger une thèse, pour laquelle il m'assura de tout son soutien scientifique.

La possibilité de disposer d'un système automatique de mesure nous a incité - d'entente avec Monsieur P.E. Pilet, directeur de ma thèse et Monsieur G. Charlap - à appliquer le système AutoAnalyseur à l'analyse des extraits de racine.

Nul mieux que le Professeur P.E. Pilet pouvait, par sa large connaissance des problèmes biologiques et son intérêt pour les méthodes nouvelles, être le guide d'un tel travail. Une thèse sur le métabolisme azoté en relation avec la croissance avait déjà été accomplie dans son Institut. Cette fois il me fut confié de diversifier et d'approfondir ces connaissances au niveau des acides aminés.

Tout au long de cette collaboration, mon directeur de

thèse m'a ouvert aux problèmes de la recherche, il m'a enrichi de ses larges connaissances débordant le cadre de ce travail. Ses conseils d'ordre rédactionnel m'ont été prodigués jusqu'à la version définitive de ce texte. De plus, il m'a témoigné de toute sa compréhension pour cette approche d'un type particulier que représente une recherche en collaboration avec l'industrie. C'est pourquoi j'exprime à Monsieur le Professeur P.E. Pilet toute ma profonde reconnaissance.

Ma vive gratitude s'adresse également à Monsieur G. Charlap, Président, et à Monsieur L. Foissac, Vice-Président de la firme Technicon, pour l'intérêt constant porté à ce travail qui fut pour moi une expérience enrichissante.

Je remercie Monsieur le Professeur J. Frei, chef du laboratoire central du Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, pour l'honneur qu'il m'a fait d'avoir bien voulu accepter de faire partie du jury de thèse.

Mes remerciements vont encore à la Direction de Technicon suisse et au laboratoire d'application de Genève pour la compréhension et l'aide reçue face aux problèmes d'automatisation. La chaîne automatique de Kjeldahl et l'analyseur d'acides aminés TSM pour les hydrolysats y furent mis à ma disposition.

Que mes collègues de l'Institut trouvent ici ma reconnaissance pour leur intérêt porté à ce travail. Leurs suggestions et leur expérience de la biologie végétale étaient précieuses; de même,le travail soigné du personnel technique de l'université fut d'une grande utilité.

TABLEAU DES ABREVIATIONS

A	Absorbance
AA	Acides aminés
CV	Coefficient de variation
nm	Nanomètre
PF	Poids frais
PS	Poids sec
PP	Pyrophosphate
s	Déviation standard
T	Transmittance
TCA	Acide trichloracétique
µM	Micromole
$\bar{x}$	Valeur moyenne d'une série

Les abréviations des acides aminés utilisées dans les tableaux et les figures correspondent à celles de la Commission de Nomenclature Biochimique (IUPAC-IUB 1967).

Le problème

L'imbibition de la graine marque le départ d'une série de profonds remaniements physiologiques et biochimiques. Des enzymes telles que les amylases, les protéases, les lipases, les oxydases, les phosphatases et d'autres, sont activées ou synthétisées de novo pour s'attaquer aux réserves des cotylédons.

Lors de la germination, les substances libérées sont transportées vers l'axe embryonnaire où s'installe une activité anabolique intense. La teneur en azote α-aminé augmente rapidement et, en général, l'apparition de la radicule hors des téguments coïncide avec l'accroissement de la teneur en protéines. Dorénavant l'axe embryonnaire est le lieu d'une protéosynthèse active. Les nouvelles protéines et les glucides accroissent le matériel des cellules qui se multiplient et qui s'allongent pour assurer ainsi la croissance de la plante.

Nombreux sont les auteurs qui ont suivi cette transformation de l'embryon en plante, au niveau des migrations de l'azote ou de quelques amides et acides aminés. Pour ce travail, nous nous sommes attachés à étudier pour les racines de Lentille et de Mais les variations de tous les acides aminés au cours des premiers stades de la croissance. Ceci suppose l'inventaire complet de tous les acides aminés libres et protéiniques et ensuite l'étude de leur gradient le long de la jeune racine. Nous avons

également suivi les changements de concentration pour les racines mises respectivement en conditions de croissance normale, en croissance inhibée par une morphactine, et en vieillissement.

Quelques travaux

Déjà en 1858 HARTIG suggère que les réserves farineuses et huileuses ("Klebermehl") riches en azote, phosphore et soufre sont détruites lors de la germination de la graine. Elles sont destinées à pourvoir les parties en croissance avec une nourriture soluble, qu'il appelle le "Gleis". Dix ans après, BOUSSINGAULT constate pour les graines germant à l'obscurité que 1) la teneur en azote total de la graine reste constante (contrairement à celle du carbone) et que 2) il y a formation de beaucoup d'asparagine. Cet amide est, pour PFEFFER (1876), identique au "Gleis" azoté de HARTIG, dont la partie non azotée correspondrait au "sucre" du gluten.

En 1906, les recherches de SCHULZE aboutissent à 10 acides aminés plus 2 amides (asparagine et glutamine) qui proviennent tous - après la germination - des protéines de réserve. A la suite des recherches de PRIANISCHNIKOW (1922) et de CHIBNALL, ce dernier résume la situation comme suit en 1939:

1) lors de la germination, les protéines de réserve subissent une digestion enzymatique donnant de l'asparagine, de la glutamine et une série d'acides aminés;

2) les produits de décomposition protéinique sont transportés vers les parties en croissance, où une deuxième décomposition de certains acides aminés donne lieu à une formation supplémentaire d'asparagine et de glutamine;

3) la synthèse protéinique des parties en croissance a lieu au dépens d'acides aminés en provenance des organes de réserve et des amides résultant des transformations secondaires;

4) les protéines des organes de réserve peuvent avoir une composition différente en acides aminés que ceux des parties en croissance.

Sur la base de ces connaissances, les techniques d'analyse sont devenues plus sensibles. Elles ont permis de différentier les mesures de l'azote soluble ou non entre la graine et l'embryon (DANIELSSON 1951; OOTA et coll. 1953; SHIRAKAWA et OTAKARA 1956; FOLKES et YEMM 1958 a,b), ou pour des segments différents de la plante dont on a pu établir des gradients azotés dans la racine (BROWN et BROADBENT 1950; MORGAN et REITH 1954; LAWRENCE et coll. 1959; PILET et SIEGENTHALER 1959 et 1962).

Les nouvelles techniques de chromatographie automatisée par échangeurs d'ions des années 1960 ont rendu possible la séparation et l'identification de plus en plus d'acides aminés (LAWRENCE et GRANT 1963; LARSON et BEEVERS 1965; STEWARD et DURZAN 1965; KELLER et PILET 1974) ou de dipeptides (SYNGE 1968). Par des marquages radioactifs, on a pu suivre l'évolution de certains acides aminés au cours de la croissance initiale de la racine (OAKS 1965; FOWDEN

1967; FOWLER 1973; SODEK et WILSON 1973).

Remarquons enfin que plusieurs auteurs ont effectué une revue systématique de tous les phénomènes physiologiques de la germination et de la croissance, et parmi eux nous nous limitons à citer : KOLLER et coll. (1962), BROWN (1965) ainsi que MAYER et SHAIN (1974).

CHAPITRE I

MATERIEL ET METHODES

A. LE MATERIEL BIOLOGIQUE

Nous avons utilisé comme matériel de recherche les jeunes racines de Lentille (Lens culinaris Medicus). La Lentille est en effet un matériel aisément cultivable, dont les propriétés de croissance sont largement connues dans notre Institut (PILET 1951; PILET 1961 a,b; PILET 1972 a) et dont on a déjà étudié le métabolisme de l'azote total (SIEGENTHALER 1963). Notre travail permet ainsi de détailler les connaissances existantes.

Les récents travaux sur les apex de racines de Mais (Zea mays c.v. Kelvedon 33) de PILET (1972 b,c et 1973) et de JOTTERAND-DOLIVO et PILET (1975) nous ont incités à étendre nos expériences à ce matériel.Ce dernier a notamment servi à l'étude spécifique de certains acides aminés (AA) dont on a suivi le métabolisme (OAKS 1963, OAKS et coll. 1970, SODEK et WILSON 1973).

1. MISE EN CULTURE

1.1. Lentille

Imbibition : Les graines sont imbibées dans l'eau déionisée pendant 4 - 6 h à l'étuve (25 °C).

Lavage : Les graines sont abondamment rincées à l'eau courante d'abord, puis à l'eau déionisée. La température des eaux de lavage doit être voisine de la température d'imbibition pour prévenir le choc thermique entraînant un retard de la germination et une irrégularité de croissance.

Germination : Les graines sont déposées en rangées aérées dans une boîte de Pétri de 19cm de diamètre, sur une couche de coton, couverte de papiers filtre et imbibée d'eau déionisée. Un papier filtre saturé d'eau déionisée est posé à l'intérieur du couvercle. Le tout est laissé pendant 24 h à l'étuve (obscurité, 25 °C).

Contrôle : Les graines dont les racines n'atteignent pas 2 - 4 mm après 24 h sont éliminées. Les boîtes sont ensuite replacées à l'étuve jusqu'au jour suivant.

Sélection : Dès que la plupart des racines ont atteint 17 - 19 mm, on arrête la culture et l'on procède à la récolte ou au traitement. Il a été montré qu'à ce stade la vitesse de croissance était maximale (PILET et WENT 1956; PILET et NOUGAREDE 1967).

1.2. Mais

Les graines de Maïs sont imbibées et lavées comme ci-dessus, mais à partir de la germination, nous avons procédé selon la technique

de PILET (1972 c), qui consiste à déposer les graines entre deux feuilles de papier de filtre verticales, humides, soutenues par des supports en plastique. Les racines de graines ainsi retenues poussent de façon plus rectiligne, ce qui est avantageux pour le découpage ultérieur en segments de 2 mm sous la loupe binoculaire.

2. TRAITEMENT

Les traitements s'effectuent in vivo dans les boîtes de Pétri. Après la sélection, les racines sont rapidement trempées dans la solution traitante et ensuite déposées dans une nouvelle boîte de Pétri, ou l'eau déionisée a été remplacée par la solution traitante. Toutes les manipulations s'effectuent sous faible lumière verte qui modifie le moins la vitesse de croissance, tout en fournissant une très bonne vision optique (WITHROW et PRICE 1957; PERNET 1973).

3. RECOLTE

A la fin du traitement, ou lorsque les racines ont atteint la longueur désirée, elles sont excisées et déposées dans de l'eau déionisée conservée au bain de glace. Elles sont ensuite séchées superficiellement sur un papier filtre, par une légère aspiration sur un support Büchner et rapidement congelées dans des tubes à centrifuger (MSE, 15 ml) en vue de la lyophilisation.

4. CONSERVATION

Après la lyophilisation par l'appareil Secfroid (0,02 mm Hg) pendant 12 à 20 h selon la quantité de racines (REY 1960 et 1964), celles-ci sont conservées à -30 ^{o}C, dans des tubes bouchés.

B. METHODES

1. PREPARATION DE L'EXTRAIT

1.1. Le solvant d'extraction

Plusieurs solvants conviennent bien pour extraire les AA libres. Ces derniers constituent un mélange à polarités très différentes dont COHN et EDSALL (1943) ont étudié en détail les comportements dans plusieurs solvants. Après une série d'essais (voir chapitre II.6.), nous avons adopté un mélange éthanol-eau (70:30, vol/vol). Ce mélange - à des proportions variables, suivant la teneur en eau du matériel à extraire - a en effet été retenu par la majorité des auteurs:

- Un mélange à 20% d'éthanol pour l'extraction de proline à partir de feuilles sèches de différentes espèces (PALFI 1973),
- ... 50% ... 5-OH-tryptophane de graines (BELL et FELLOWS 1966),
- ... 60% ... AA libres de Pomme de terre (SCHALLER et WUNSCH 1973),
- ... 70% ... AA libres de germes secs (LAWRENCE et GRANT 1963),
- ... 70% ... AA libres de Farine (BOULTER 1966),
- ... 70% ... AA libres d'épicotyles de Soja (HOLLEMAN et KEY 1967),
- ... 70% ... AA libres de pollen (LINSKENS et SCHRAUWEN 1969),
- ... 75% ... AA libres d'embryons frais (RYCZKOWSKI 1972),

- ... 80% ... AA libres de graines fraîches (LARSON et BEEVERS 1965),

- ... 80% ... AA libres de Ray-grass lyophilisé (BATHURST 1953),

- ... 80% ... AA libres dans la pulpe de fruits (KRISHNA-MURTHY et coll. 1971),

- ... 80% ... AA libres dans le parenchyme (BEMILLER 1972),

- ... des concentrations décroissantes de 97 - 80 - 60 - 20 - 0% d'éthanol-eau pour l'extraction des AA dans les tissus frais de Tabac (VALLEE et coll. 1968).

1.2. Broyage et agitation

Aux racines sèches et congelées, pesées dans les tubes MSE, on ajoute une quantité de solvant froid, correspondant à environ 120 fois leur poids sec en g. Chaque tube est plongé dans un bain froid d'alcool (à environ -15 °C) et le broyage s'effectue pendant 2½ min. à l'aide du broyeur Polytron (Kinematica GMBH, Lucerne), tournant à sa vitesse maximale de 10m/sec. Après le broyage, le rotor est rincé une fois avec du solvant qui est récupéré pour l'extraction.

Nous avons préféré ce broyeur au Potter. En effet, l'examen au microscope optique montre que le broyat est nettement plus fin au Polytron; de plus, la concentration en AA s'y avère d'environ 30% supérieure.

L'extraction se fait en 5 fois 5 min. par agitation sur le vibreur Vortex. La première se fait dans le solvant de broyage et les suivantes ont lieu dans un volume de solvant proportionnel au poids

sec (en général, le nombre de ml de solvant est choisi égal au nombre de g de poids sec multiplié par 60. Après chaque extraction, les tubes sont centrifugés pendant 4 min. à 4.000 g sur la centrifugeuse MSE, type Super Minor, et tous les surnageants sont réunis. Nous avons pris soin à ce que la température de l'extrait ne dépasse pas 30 °C au cours de toutes ces opérations.

1.3. Concentration

L'extrait est évaporé à sec dans le rotavapor (< 35 °C), ensuite il est repris dans une solution 0,01 N de HCl. La quantité ajoutée est en rapport direct avec le poids sec des racines, afin d'avoir des concentrations finales du même ordre de grandeur pour les charges de chromatographie.

1.4. Conservation

Après la préparation d'une série d'essais, nous ne pouvons effectuer l'analyse par chromatographie que d'un seul échantillon par jour, les autres devant être conservés.

1.4.1. Extrait

On ajoute 10% d'isopropanol en tant qu'agent antimicrobien à l'extrait ci-dessus qui est ensuite filtré (Millipore, 0,22 um) et conservé congelé (-30 °C) jusqu'à l'analyse chromatographique. Avec le matériel choisi (très jeune, étiolé), il n'est en effet pas nécessaire d'éliminer des lipides ou de la chlorophylle ...

1.4.2. Culot

Les culots de centrifugation réunis sont séchés, pesés et conservés congelés (-30 °C) en attendant l'hydrolyse ultérieure.

2. HYDROLYSE DU CULOT

Le culot insoluble à l'éthanol contient toutes les protéines et les gros peptides (LAWRENCE et coll. 1959; STEWARD et BIDWELL 1962; OAKS 1966; SODEK et WILSON 1973; KELLER et PILET 1974). Ces auteurs ont donc utilisé le culot insoluble à l'éthanol pour en analyser, après hydrolyse, les AA essentiellement constitutifs des protéines.

Notons cependant que :

1) certaines protéines, tel que le groupe des prolamines, sont solubles dans l'éthanol, mais leur présence se limite aux graines et elles sont absentes de la plantule (STEWARD et DURZAN 1965; MOSSE 1966);

2) le culot éthanolique contient également les acides nucléiques, les débris de parois et d'organelles cellulaires, composés essentiellement de glycoprotéines (LAMPORT 1970), ainsi que de faibles quantités d'azote lié à des alcaloides, des glucides, des nucléotides, des pigments, des auxines ... (SYNGE 1968).

2.1. Solution d'hydrolyse

L'hydrolyse des protéines peut être effectuée essentiellement

selon trois procédés différents qui ont été revus en détail par LIGHT et SMITH (1963) et surtout par HILL (1965) :

1) L'hydrolyse enzymatique qui est généralement incomplète pour la plupart des AA, dont elle préserve pourtant bien les structures (TOWER et coll. 1962; HILL et SCHMIDT 1962).

2) L'hydrolyse alcaline qui libère le tryptophane, mais qui attaque une série d'AA tels que la sérine, la thréonine, la cystéine etc., qui peuvent se transformer en d'autres AA (SANGER 1952; LEACH 1953).

3) L'hydrolyse acide qui libère les AA, mais elle convertit les amides asparagine et glutamine en leurs AA correspondants. Le tryptophane est perdu et la sérine, la thréonine et éventuellement d'autres peuvent être partiellement dégradés. L'importance de ces pertes dépend des conditions d'hydrolyse et des protéines (REES 1946; MOORE et STEIN 1963).

Nous avons adopté l'hydrolyse acide - la plus répandue - pour obtenir un maximum de données quantitatives. Nous utilisons la solution classique de HCl 6 N, distillée 3 fois (mélange azéotrope à 108 ^{o}C), pour des besoins de pureté et de constance de concentration. Ce réactif est utilisé par la grande majorité des auteurs (HIRS et coll. 1954; TRISTAM et SMITH 1963; LAWRENCE et GRANT 1963; OAKS 1963; LARSON et BEEVERS 1965; INGVERSEN et IVANKO 1971 etc.).

2.2. Procédé

Les conditions d'hydrolyse favorisent l'oxydation des AA

libérés. De ce fait, il est avantageux de l'effectuer dans une atmosphère inerte, soit sous vide ou sous azote gazeux. Deux types de récipient s'offraient à notre choix : des tubes en verre à sceller sous vide ou des fioles avec valves. C'est ce dernier système (Mininert) que nous avons adopté, principalement pour des raisons pratiques : l'étanchéité de l'ensemble, mis sous une légère pression d'azote, est en effet facilement contrôlable en actionnant la valve; de plus, les tubes sont réutilisables de nombreuses fois.

Nous avons monté un robinet à 3 voies, branché resp. au vide, à l'azote et à la valve du Mininert. Dans ce dernier on a posé au préalable le culot sec à hydrolyser suivi d'un volume de HCl 6 N correspondant à ml = 750 x PS_{Culot} en mg. Pendant 40 sec., on fait le vide dans le Mininert, suivi de 20 sec. de remplissage de l'azote à environ 1 atm. de pression. Cette double opération est répétée 2 fois et l'on refait à nouveau le vide.

Les fioles bien fermées sont placées dans un four, au bain de sable, à 110 ^{o}C. Après 30 h (voir: optimisation de la durée d'hydrolyse, Chap II.2.1.), elles sont immédiatement placées au congélateur, afin d'interrompre tout phénomène ultérieur d'hydrolyse et de dégradation.

2.3. Concentration et conservation

Tout comme pour l'extrait, la concentration s'effectue par évaporation au rotavapor. Au préalable, on triple le volume de l'hydrolysat par de l'eau distillée, pour diminuer l'acidité. Le mélange HCl-eau s'évapore moins vite que l'éthanol, c'est pourquoi on travaille à une température plus élevée, limitée à

un maximum de 60 °C, ce qui correspond à celle de l'analyse chromatographique subséquente. Le résidu sec est repris dans la première solution tampon de chromatographie (pH 2,87) et le tout est filtré sur Millipore comme pour l'extrait.

L'hydrolysat se conserve tout comme l'extrait, au congélateur.

3. MESURES ET ANALYSES

3.1. Longueur et poids

La longueur des racines est mesurée à l'aide d'une fine réglette graduée en 0,5 mm. Le poids frais des racines excisées est déterminé après le séchage externe sur Büchner; le poids sec des racines et celui du culot éthanolique sont déterminés immédiatement après la lyophilisation.

3.2. Azote et Phosphore total

Les mesures de l'azote et du phosphore total après minéralisation se font de façon automatique sur l'AutoAnalyseur. L'analyse manuelle - annoncée la première fois en 1883 pour l'azote total par Kjeldahl - peut être automatisée de façon plus ou moins complète, suivant que l'étape de minéralisation fait ou non partie de la chaîne automatique. Nous avons appliqué les deux variantes :

3.2.1. Mesure entièrement automatique par le "Digesteur Continu"

Le système fonctionne en continu à partir d'échantillons liquides, non minéralisés. Il se compose d'un distributeur d'échantillons, d'une pompe péristaltique du type P III avec "air bar" et une capacité de 26 tubes de pompe; d'un jeu de tubes et de connexions pour l'entrée dans le "Digesteur"; d'un "Digesteur continu"; d'une deuxième pompe péristaltique, avec un jeu de tubes de prédilution et de neutralisation; de 2 cassettes analytiques (N et P) abritant les bobines de mélange et les bains-marie; de 2 colorimètres du type "SCIC" avec 2 cuvettes de flux continu; d'un enregistreur double de compensation et d'une imprimante à deux canaux.

3.2.1.1. Principe de réaction

La détermination de l'azote et du phosphore total implique la minéralisation de la matière organique par le "Digesteur continu", suivie par les mesures colorimétriques de l'ammoniaque et de l'orthophosphate libérés.

- Azote

  La détermination de l'ammoniaque est basée sur la réaction du salycilate de sodium avec un donneur de chlore (dichloroisocyanate de Na) et le nitroprussiate de sodium en pH alcalin, en tant que chromogène. Le complexe rouge de salycilate d'ammonium est mesuré par colorimétrie à 660 nm (WEBER 1973).

- Phosphore

  L'orthophosphate réagit avec le molybdate d'ammonium en formant de l'acide phosphomolybdique. Ce dernier est réduit par l'acide ascorbique et le complexe

phosphomolybdique résultant est mesuré à 660 nm.

3.2.1.2. Jeux de tubes

Les schémas des jeux de tubes sont basés sur ceux préconisés par WEBER (1973) pour l'analyse des échantillons de viande. L'analyse des échantillons liquides a cependant entraîné une série de modifications au niveau du prélèvement, des connexions et des rapports de mélange. Les schémas modifiés sont représentés respectivement à la figure 1 (entrée au "Digesteur continu"), à la figure 2 (détermination de l'azote) et à la figure 3 (détermination du phosphore).

3.2.1.3. Solutions de réactifs et d'étalons

1) Acide sulfurique 95-98%

2) Peroxyde d'hydrogène 30-35%

3) Diluant pour l'hélice du digesteur: H_2O dist.

4) Diluant pour le phosphore:

mouillant Levor IV	1 ml
H_2O dist. q.s.p.	1000 ml

5) Solution de tartrate potassique d'antimoine:

K (SbO) $C_4H_4O_6 . \frac{1}{2}H_2O$	3,0 g
H_2O dist. q.s.p.	1000 ml

6) Réactif au molybdate d'ammonium:

$(NH_4)_6 Mo_7 O_{24} . 4H_2O$	10 g
Acide sulfurique conc.	1 ml
Tartrate potassique d'antimoine 0,3%	50 ml
H_2O dist. q.s.p.	1000 ml

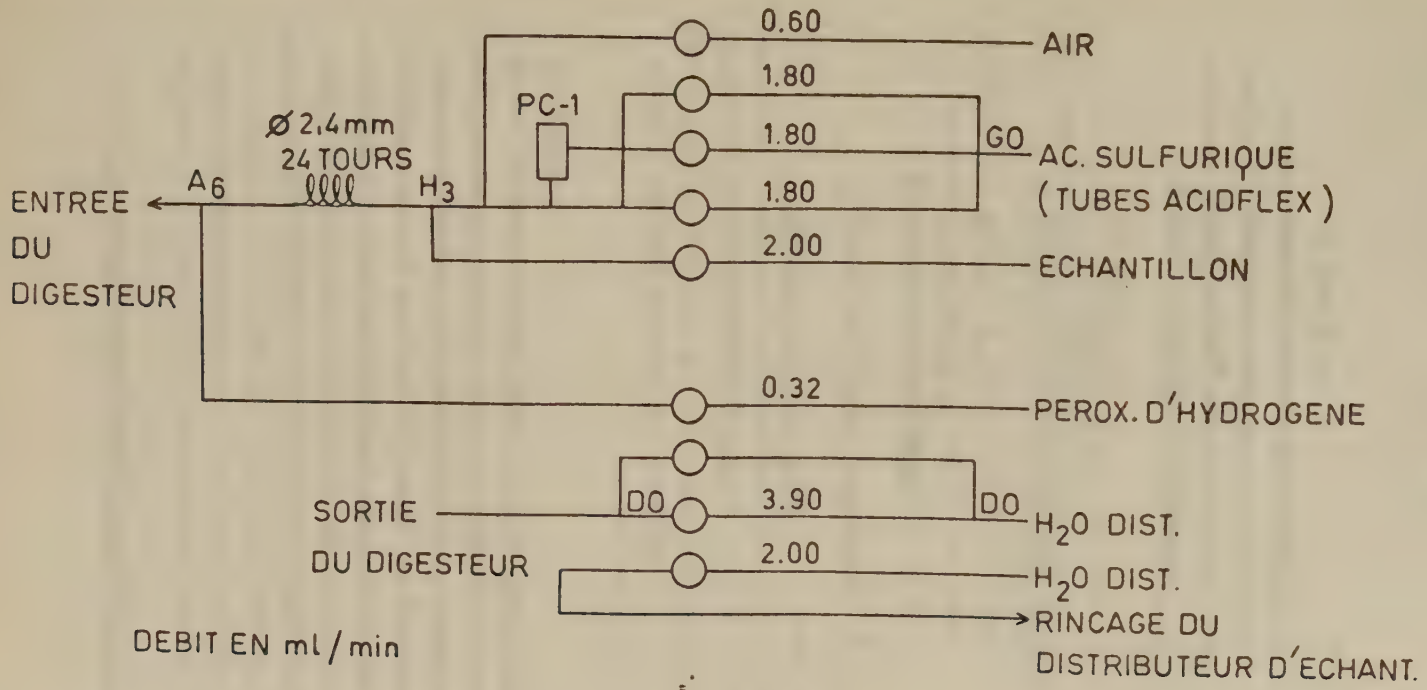


FIGURE 1

Schéma du jeu de tubes d'entrée au "Digesteur continu".

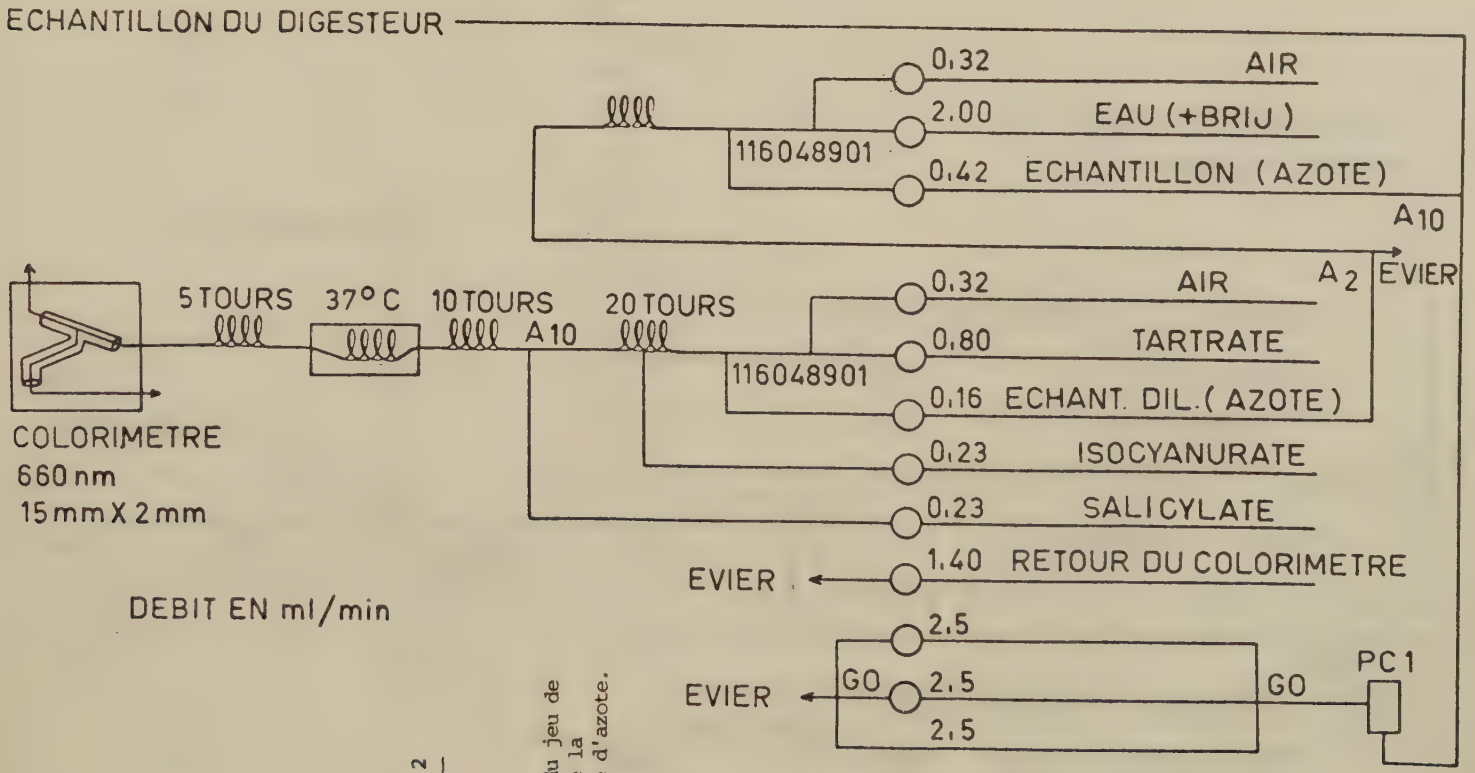


FIGURE 2

Schéma du jeu de tubes de la cassette d'azote.

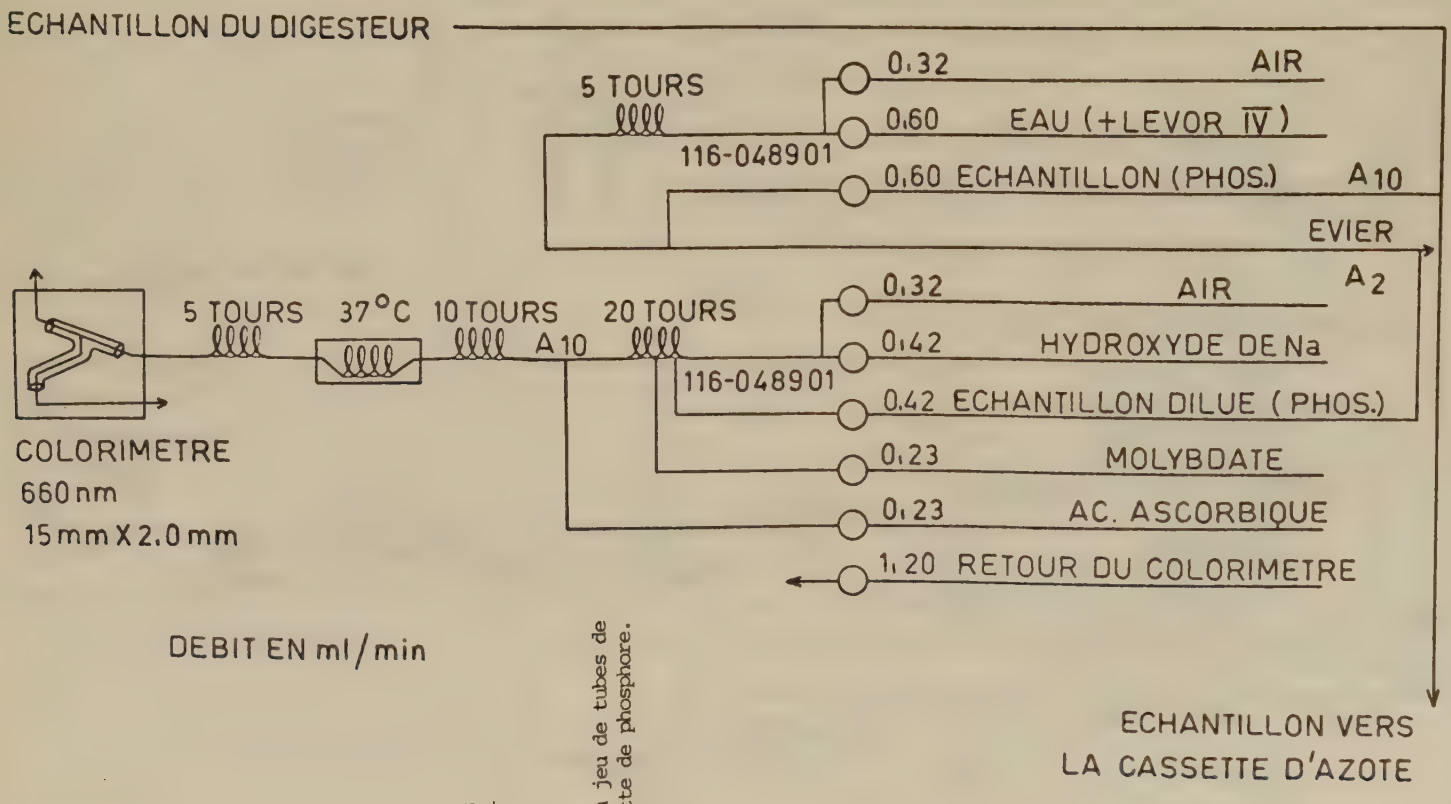


FIGURE 3

Schéma du jeu de tubes de la cassette de phosphore.

7) Réactif à l'acide ascorbique:

$C_6H_8O_6$	17,6	g
Acétone	50	ml
H_2O dist. q.s.p.	1000	ml

8) Diluant pour l'azote:

Brij-35 (mouillant)	1	ml
H_2O dist. q.s.p.	1000	ml

9) Solution alkaline de tartrate potassique de sodium:

$NaKC_4H_4O_6.4H_2O$	50	g
Hydroxyde de Na 50%	60	g
H_2O dist. q.s.p.	1000	ml

10) Solution de salicylate de sodium:

Salicylate de Na : $(C_6H_4$ (OH) COONa)	220	g
Nitroprussiate de Na : $Na_2Fe(CN)_5NO.2H_2O$	175	ml
H_2O dist. q.s.p.	1000	ml

11) Solution de dichloroisocyanurate de sodium:

Sel de dichloroisocyanurate disodique	5	g
Hydroxyde de sodim 50%	50	g
Brij-35	3	ml
H_2O dist. q.s.p.	1000	ml

12) Solutions-étalon:

Pour l'étalonnage de l'azote, on utilise une solution de gelatine; pour le phosphore, une solution de dihydrophosphate de potassium. Par des dilutions successives, on établit une gamme-étalon entre 0,5 et 5,0% des éléments à doser.

3.2.2. Mesure semi-automatique par le "Block digestor"

Le système fonctionne en 2 parties :

1) la minéralisation par la méthode Kjeldahl qui s'effectue dans un bloc chauffant contenant 40 tubes d'échantillons (Fig 4);

2) la mesure colorimétrique du sulfate d'ammonium libéré, après transfert dans l'AutoAnalyseur II (Fig 5).

Nous avons procédé de la manière suivante :

- minéralisation

On pipette 2 ml de l'extrait, resp. de l'hydrolysat dans chaque tube du "Block digestor". On ajoute 6 ml de H_2SO_4 conc. et l'on agite légèrement au Vortex. Ensuite l'on ajoute 2 ml de H_2O_2 qui donne une réaction très vive, après agitation. Après 15 min d'attente, on ajoute une pastille de catalyseur (1,5 g K_2SO_4 + 7,5 g Se) et on glisse le support de 40 tubes dans le "Block digesteur" porté à 300 ^oC au préalable. Après 20 min les échantillons sont limpides; on enlève alors le support avec les tubes auxquels on ajoute de l'eau bidistillée pour refroidir et diluer jusqu'au 3/4 de hauteur. Après 30 min d'attente, on remplit jusqu'au trait (75 ml) avec de l'eau bidistillée et, après une homogénisation au Vortex, on verse quelques ml dans le godet de l'AutoAnalyseur II.

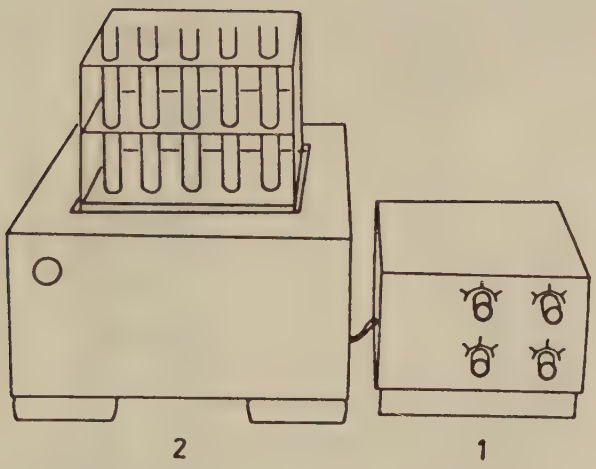


FIGURE 4

Représentation des modules du "Block digestor" Technicon.

1 : Régulateur thermique

2 : Unité de chauffage

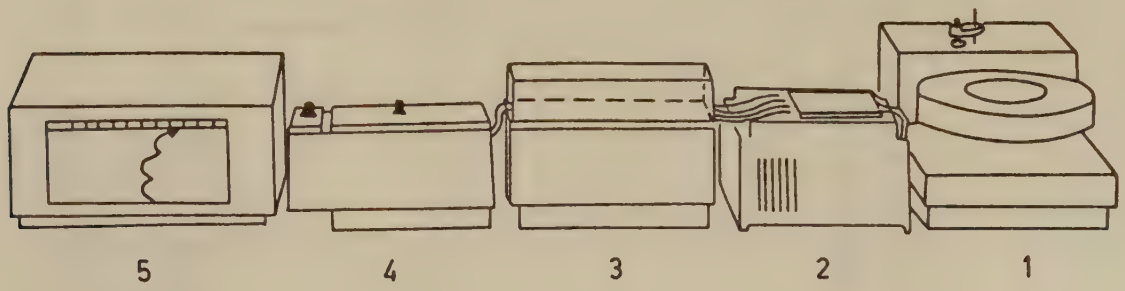


FIGURE 5

Représentation de la chaîne d'analyse automatique, "AutoAnalyseur" Technicon.

1 : Distributeur d'échantillons
2 : Pompe péristaltique
3 : Cassette analytique
4 : Colorimètre
5 : Enregistreur

- mesure de l'azote minéralisé

Les godets sont posés sur le distributeur d'échantillons d'où ils sont aspirés dans le système. La réaction, l'enregistrement et l'impression des résultats se font - à une cadence de 60 échantillons à l'heure - de la même façon qu'après la digestion continue.

3.3. Acides aminés

3.3.1. Généralités

Les AA sont analysés par chromatographie échangeuse d'ions d'après le principe de MOORE et STEIN (1963). L'analyse des extraits se fait pendant une durée de 15 à 18 h sur le système NC-1 (EFRON 1965), que nous avons modifié; celle des hydrolysats, pendant 104 min sur le système TSM (VON ARX et coll. 1974).

3.3.2. Analyse des extraits

3.3.2.1. Description du système NC-1 modifié

Le système NC-1 permet la séparation et l'analyse subséquente des AA. La charge de l'échantillon s'effectue de façon manuelle, mais l'élution et la régénération ont été automatisées. Une série d'éléments et de modules composent la chaîne (Fig 6) :

FIGURE 6

Diagramme du flux du système NC-1 modifié.

- L'autograde

c'est un récipient de 9 chambres communicantes permettant de créer un gradient continu de solutions tampon. Les bases théoriques pour l'établissement d'un gradient désiré ont été décrites par PETERSON et SOBER (1959) ainsi que par BURNS et coll. (1965).

- La pompe à haute pression

elle assure un flux régulier des solutions tampons à travers la colonne à une pression moyenne d'environ 30 bar.

- La colonne et la résine

on travaille avec une seule colonne en verre de 130 cm de long et 0,6 cm de diamètre intérieur. Elle est entourée d'un manteau d'eau de thermostatisation. La résine, cationique, à 8% de réticulation, comporte des groupements réactifs sulfoniques; ses granules sphériques, en polystyrène divinylique, ont un diamètre de 17 ± 2 um (Technicon Chromobeads B).

- Le bain-marie de circulation, du type Haake

il permet de chauffer l'eau à une température donnée et en assure la circulation autour de la colonne. Nous y avons monté en série un deuxième thermomètre de contact (Fig 7), permettant de changer de température au cours de la chromatographie. Ce changement est commandé par une horloge électrique de contact.

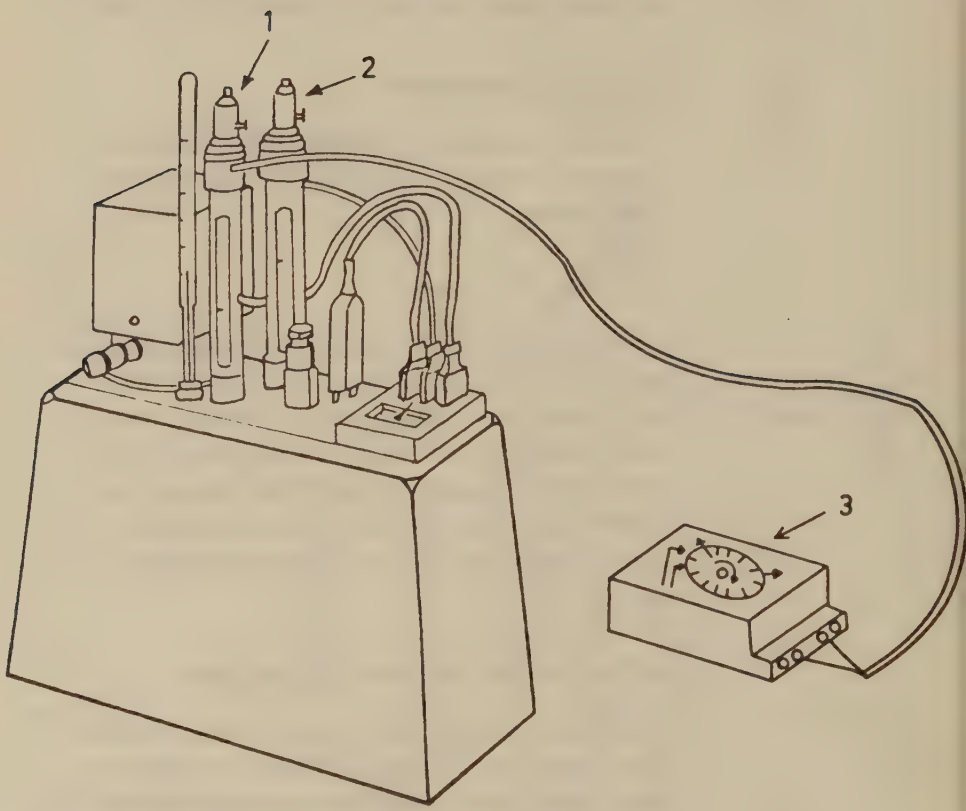


FIGURE 7

Bain-marie de circulation avec deux régulateurs thermiques (1 et 2) commandés par une horloge de contact (3).

- La pompe péristaltique P1

elle assure - grâce aux tubes de pompe calibrés - la progression de l'éluat de colonne et des réactifs.

- Le jeu de tubes

il a été modifié selon le modèle du TSM (BONNAFE 1974), permettant surtout de pomper séparément les deux composantes du réactif à la ninhydrine, qui ne devient réactif qu'une fois mélangé dans le système. La ninhydrine dissoute peut ainsi se garder plusieurs mois dans l'atmosphère du laboratoire.

Pour obtenir une segmentation parfaite à l'azote, nous avons placé un double circuit de tubes d'azote, afin d'injecter celui-ci sous pression dans le flux liquide.

- Le bain-marie de réaction

il permet le développement de couleur de chaque AA avec la ninhydrine. La longueur de la spirale de réaction est telle que, pour le débit donné, la réaction dure 8 min. A ce bain, nous avons ajouté un circuit de refroidissement. Il en résulte un contrôle plus rigoureux de la température, ce qui évite les à-coups du flux à la sortie, procurant ainsi une ligne de base plus stable du chromatogramme.

- Les 2 colorimètres

ils comportent chacun une cuvette de flux continu de

15 mm de long; la première avec débulleur, la deuxième montée en série sur la sortie de la première. Le premier colorimètre mesure les densités optiques à 570 nm, le deuxième à 440 nm. Le troisième colorimètre, avec une cuvette de 8 mm (570 nm), pour la mesure des pics très élevés, s'est avéré superflu: dès qu'un pic dépasse une densité optique de 1,5 à 570 nm, on le mesure sur le canal à 440 nm.

- L'enregistreur

il est à points et interroge alternativement les colorimètres numéro un et deux en traçant le chromatogramme à deux longueurs d'onde différentes.

- Les vannes automatiques et horloges de contact

afin d'automatiser aussi l'élution et la regénération après un cycle d'analyse, nous avons monté deux vannes (v) électromagnétiques en série, commandées par des horloges de contact. Lors du déroulement du chromatogramme, la v_1 est en contact avec l'autograde; à la fin du chromatogramme, elle se branche sur la v_2 qui accepte d'abord la solution d'élution, ensuite le tampon de regénération. Un dernier cavalier de l'horloge éteint tous les modules.

3.3.2.2. Solutions de réactifs et d'étalons

1) Tampon acétate de sodium 4N:

- Acétate de sodium anhydre	1640 g
- Acide acétique glacial	500 ml
- Eau distillée, q.s.p.	5000 ml

2) Réactif à la ninhydrine à 1%:

- Ninhydrine	40 g
- Méthyl cellosolve	2000 ml
- Tampon acétate de sodium 4N	800 ml
- Acide acétique glacial	200 ml
- Eau distillée, q.s.p.	4000 ml

3) Solution de sulfate d'hydrazine 1 mM:

- Sulfate d'hydrazine	1049 mg
- Eau distillée	4000 ml

4) Tampon d'élution à pH 2,87:

- Citrate de sodium $C_6H_5Na_3O_7.2H_2O$	73,55 g
- Eau distillée, q.s.p.	5000 ml
(le pH est ajusté à l'aide de HCl)	

5) Tampon d'élution à pH 4,74:

- Citrate de sodium	392,76 g
- Eau distillée, q.s.p.	5000 ml

3.3.2.3. Réaction à la ninhydrine

La réaction se déroule en deux étapes (MAHLER et CORDES 1971). Dans une première phase, la ninhydrine agit en tant qu'oxydant qui cause la désamination oxydative du groupe α-aminé, libérant de l'ammoniaque, du dioxyde de carbone, l'aldéhyde correspondant et une forme réduite de la ninhydrine. Pendant la deuxième phase, l'ammoniaque formé réagit avec la ninhydrine réduite et une nouvelle molécule de ninhydrine, pour former une substance violette, absorbant près de 570 nm (Fig 8). Avec les prolines, le complexe coloré est jaune et l'absorption est à 440 nm.

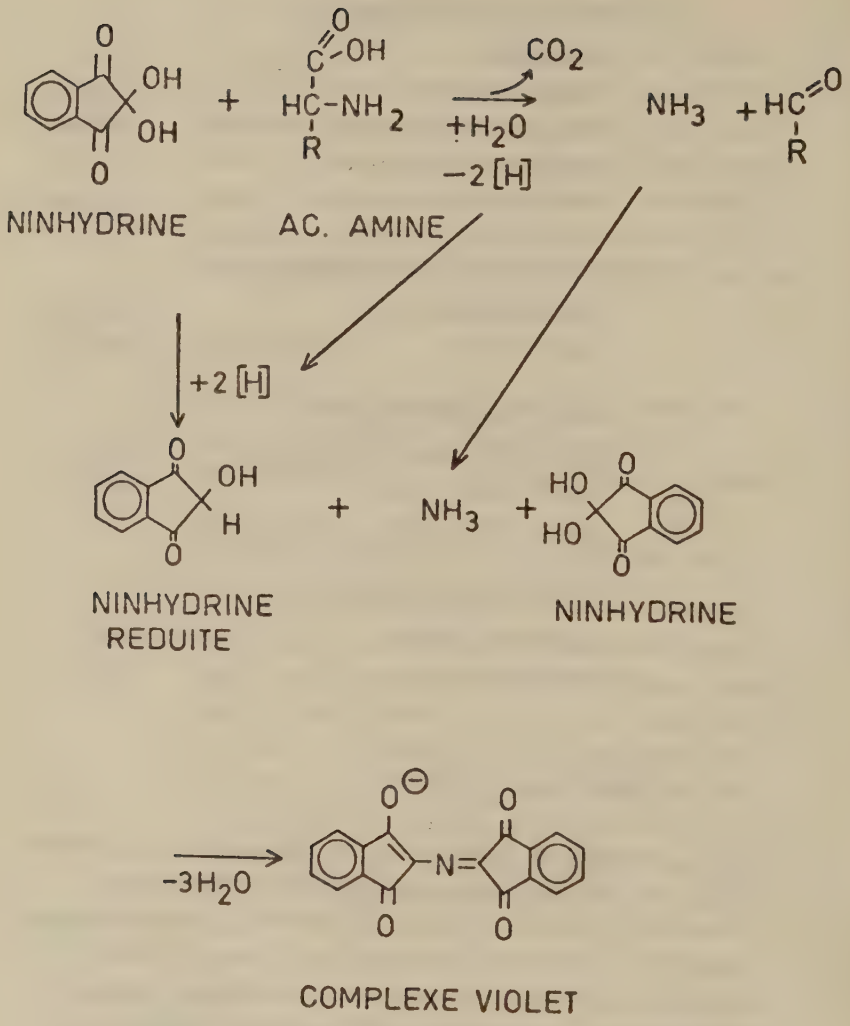


FIGURE 8

Schéma de la réaction à la ninhydrine (adapté de KARLSON 1971).

Le maximum d'absorption à 570 nm se situe au pH 5,51 (Fig 9), c'est pourquoi on ajoute une solution à fort pouvoir tampon au réactif à la ninhydrine, en vue d'absorber les variations de pH en provenance de la colonne.

3.3.2.4. Calcul de la concentration d'un AA

Le calcul de la concentration d'un AA est précédé de quelques mesures qui se rapportent au pic représenté à la figure 10. On mesure la hauteur absolue (H_{abs}) et la hauteur de la ligne de base (H_{lb}) du chromatogramme. On détermine ensuite la hauteur nette (H_n) et la ligne à mi-hauteur ($L_{1/2h}$):

$$H_{abs} - H_{lb} = H_n$$

$$H_{n/2} + H_{lb} = L_{1/2h}$$

La multiplication de cette dernière valeur par le nombre d'intervalles (nI) situés au-dessus de $L_{1/2h}$ donne la surface du pic de l'AA (S_{AA}):

$$nI \times L_{1/2h} = S_{AA}$$

De la même façon on établit la surface S_{Nle} de la norleucine, étalon interne.

$$\frac{S_{AA}}{S_{Nle}} = Eq\ Nle \qquad \text{(équivalent norleucine)}$$

La concentration d'un AA s'établit selon la formule suivante:

$$\frac{Eq\ Nle_{AA}}{Eq\ Nle_{Etal.}} \times \left[Etal.\right] \times \frac{dilution\ Echant.}{charge\ Echant.} \times 100\ mg\ PS$$

$$= \mu M\ AA/100\ mg\ PS$$

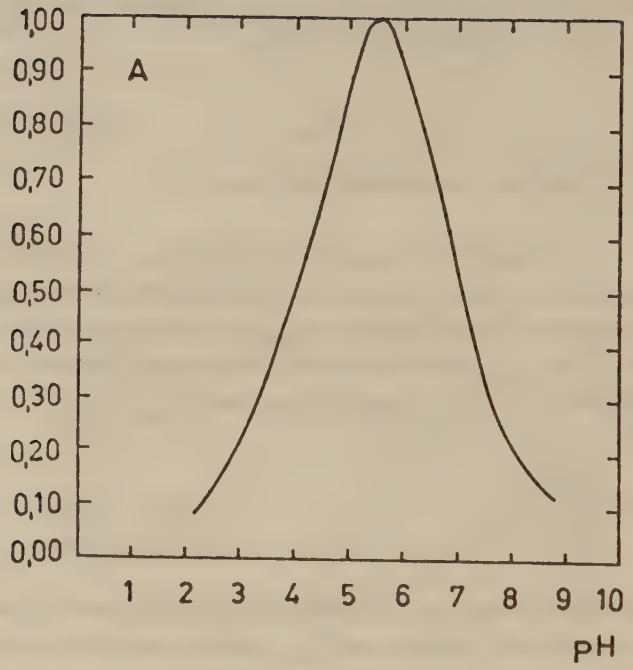


FIGURE 9

Variation de l'intensité de coloration à la ninhydrine (570 nm) en fonction du pH par la mesure de l'absorbance (A) enregistrée par l'appareil TSM.

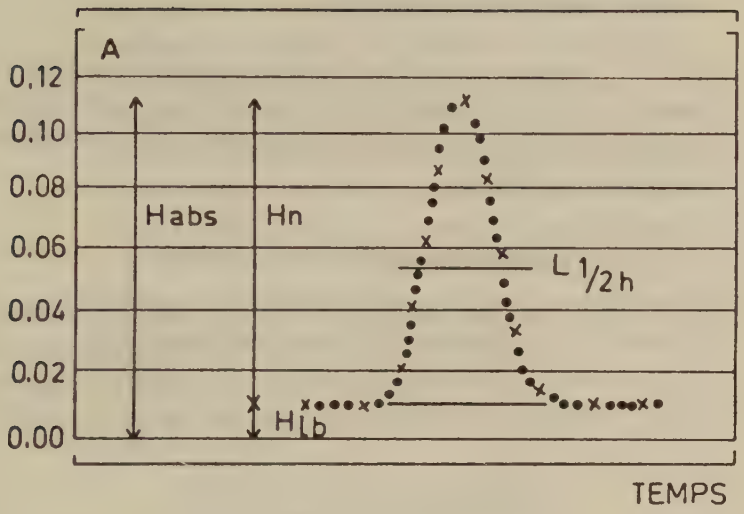


FIGURE 10

Paramètres de mesure pour le calcul de la surface du pic d'un acide aminé enregistré par l'appareil NC.

H_{abs} = Hauteur absolue

H_{lb} = Hauteur de la ligne de base

H_n = Hauteur nette

$L_{1/2h}$ = Ligne à mi-hauteur

3.3.2.5. Identification des pics

L'identification des pics d'un échantillon se base en premier lieu sur la comparaison du chromatogramme avec celui d'un étalon analysé dans les mêmes conditions. Plusieurs critères ont retenu notre attention :

- La durée de rétention sur la colonne

Pour des conditions d'élution égales, les chromatogrammes de l'étalon et de l'échantillon sont superposables et l'on peut ainsi identifier la majorité des pics courants par leur ordre de sortie connu.

- Le rapport de surface à nm 440/570

L'expérience montre que ces rapports sont relativement constants : $\frac{\text{DO à 440 nm}}{\text{DO à 570 nm}} = 0,20$ environ.

Il est cependant plus élevé pour l'asparagine, l'acide glutamique, la cystéine, l'hydroxyproline et la proline qui peuvent ainsi être repérés en cas de mauvaise séparation.

- Variations du pH du tampon

Une série d'AA sont très sensibles aux variations du pH. Ainsi, une élévation de 0,05 unités de pH seulement, avance le pic de la citrulline et celui de la cystéine d'environ 2 cm, alors que cette augmentation est pratiquement sans effet sur les autres AA.

- Variation du sel du tampon

De nombreux auteurs travaillent avec des sels de

lithium à la place du sodium (PERRY et coll. 1968; OULEVAY et HEITEFUSS 1974; MAC GALE et IAN 1974), ou encore avec un mélange des deux sels (YOUNG et YAMAMOTO 1973). Le changement entraîne une modification de l'ordre de sortie de certains pics. Ainsi, notre extrait élué au lithium voit avancer de beaucoup l'acide glutamique, reculer la glutamine (qui se sépare bien de la sérine), reculer la méthionine derrière la cysthationine et avancer la bêta-alanine et l'acide bêta-aminobutyrique devant la tyrosine. Ce test nous a permis de confirmer la présence de la glutamine, de la bêta-alanine et de l'acide bêta-aminobutyrique.

- Surcharge d'acides aminés connus

C'est un moyen d'investigation des pics inconnus: on ajoute à l'extrait à tour de rôle un AA connu dont on sait qu'il sort dans la même région du chromatogramme que le pic inconnu. Une augmentation du pic "inconnu" à la suite de la surcharge constitue un bon indice d'identité; un pic supplémentaire à côté certifie la non identité.

- Hydrolyse partielle de l'extrait

Ce procédé permet de déceler les pics d'amides et des peptides qui réagissent (faiblement) à la ninhydrine. Un extrait fragmenté en plusieures aliquotes peut ainsi être chargé tel quel, ou après une hydrolyse de 2 h, de 12 h ou de 30 h. L'hydrolyse de 2 h coupe surtout les liaisons des di- et tripeptides et oxyde partiellement les amides asparagine et glutamine en

leurs AA correspondants. Il en résulte une diminution des pics atteints et une augmentation des autres. L'hydrolyse prolongée provoque progressivement la disparition totale des peptides de plus en plus gros extraits, en faveur de leurs AA constitutifs.

- Récolte de pics inconnus

Nous avons procédé à cette récolte pour déterminer la composition en AA de peptides extraits. Une aliquote de l'éluat de colonne est dévié par un tube de pompe (0,42 ml/min) vers un collecteur de fractions, le surplus de l'éluat allant vers le système analytique qui trace le chromatogramme. En tenant compte du temps de passage dans le bain-marie de réaction et dans les colorimètres, il est facile de faire correspondre le pic à tester du chromatogramme aux godets collectés. Le contenu d'un ou de plusieurs de ces derniers est hydrolysé normalement (30 h) et rechargé pour déterminer la teneur en AA.

- Autres effets sur l'élution

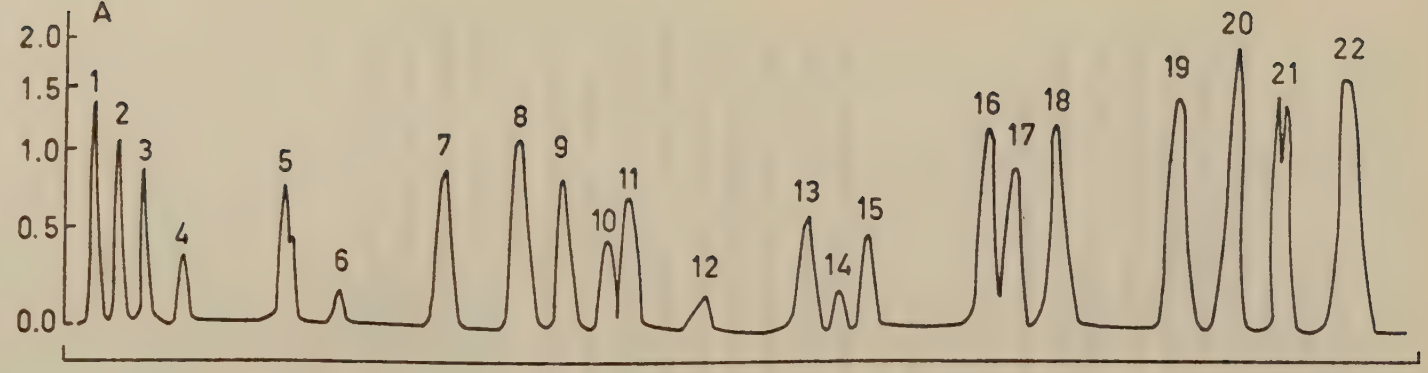
Différents auteurs ont décrit l'influence sur la durée de rétention des AA, de la température d'élution, de la réticulation de la résine, de la force ionique des tampons ou de l'interaction de ces différents facteurs (HAMILTON 1963; JENSEN 1965; KURASHI et coll. 1966; LONG et GEIGER 1971).

3.3.2.6. Chromatogramme-étalon

Nous avons vu plus haut que pour le calcul de la concentration, il est indispensable de se référer à une solution-étalon, contenant tous les AA présents dans l'extrait. Nous utilisons la solution-étalon Technicon pour liquides physiologiques, contenant 38 AA, à une concentration de 2,5 µM/ml pour la plupart. A cet étalon, nous ajoutons les AA manquants pour obtenir notre chromatogramme de référence complet (Fig 11).

3.3.2.7. Feuille-type de résultats

Nous inscrivons les valeurs d'un chromatogramme sur une même feuille de résultats préparée (Tab 1). Celle-ci est indispensable pour la consultation rapide des valeurs ou pour la comparaison des valeurs de différents chromatogrammes. Les noms des AA figurent au milieu de la feuille; la partie de gauche est réservée aux valeurs de l'étalon, la droite à celles de l'échantillon. A côté des surfaces, nous avons prévu une colonne pour l'inscription éventuelle des hauteurs de pics. Cette indication s'avère utile dans le cas de certains pics mal séparés ou présents sous forme d'épaule. Ces résultats sont traités sous réserve, bien que la mesure de la hauteur (de pics bien séparés) soit équivalente (NAUMANN 1969), voire supérieure (KIRKMANN 1974) pour l'évaluation de la concentration. Nous pensons cependant que cette dernière affirmation n'est valable que pour des pics très étroits.


A
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

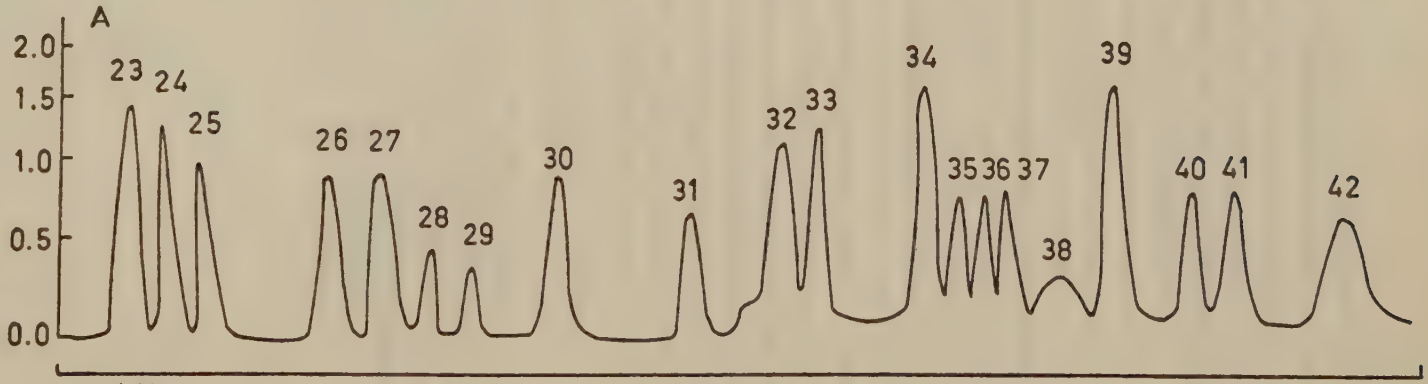

A
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

FIGURE 11

FIGURE 11

Chromatogramme-étalon pour les liquides biologiques.

Système d'élution à deux tampons, basé sur le travail de EFRON (1965).

Charge : 50 µl d'un mélange de 41 acides aminés (à 2,5 uM/ml chaque, sauf indication contraire);

Etalon interne : Norleucine;

Identification des pics :

1.Acide cystéique - 2.Taurine - 3.Orthophosphoéthanolamine - 4.Urée (10 µM/ml) - 5.Méthionine sulfoxydes - 6.Hydroxyproline - 7.Méthionine sulfone - 8.Acide aspartique - 9.Thréonine - 10.Asparagine - 11.Sérine - 12.Sarcosine (7,5 µM/ml) - 13.Acide glutamique - 14.Proline -15.Citrulline - 16.Glycine - 17.Glutathion réduit - 18.Alanine - 19.Valine - 20.Cystine - 21.D,L-Cystathionine - 22. Méthionine - 23.Isoleucine - 24.Leucine - 25.Norleucine - 26.Tyrosine - 27.Phénylalanine - 28.bêta-Alanine (5 µM/ml) - 29.Acide bêta-aminobutyrique - 30.Acide gamma-aminobutyrique - 31.Ethanolamine - 32.Ammoniaque - 33.Ornithine - 34. Lysine - 35.alpha-Méthylhistidine - 36.epsilon-Méthyllysine - 37.1-Méthylhistidine - 38. Tryptophane - 39.Histidine - 40.3-Méthylhistidine - 41.Carnosine (5 µM/ml) - 42.Arginine.

TABLEAU I

Feuille-type destinée à exprimer les résultats relatifs aux acides aminés de l'extrait - par exemple - des racines de Lentille.

TABLEAU I

µl ETALON, le ____ HAUT.	SURF.	Eq.Nle	ACIDES AMINES et SUBST. POSITIVES à la NINHYDR.	µl ECHANTILLON, le ____ HAUT.	SURF.	Eq.Nle	FACT.	µMOL.
			1 Inconnu					
			2 Inconnu					
			3 Urée					
			4 Peptide					
			5 Peptide					
			6 Peptide					
			7 Peptide					
			8 Méthionine sulfoxyde					
			9 Méthionine sulfone					
			10 Ac aspartique					
			11 Thréonine					
			12 Asparagine					
			13 Sérine					
			14 Glutamine					
			15 Peptide					
			16 Peptide					
			17 Peptide					
			18 Ac glutamique					
			19 Proline					
			20 Glycine					
			21 Glutathion					
			22 Alanine					
			23 Valine					
			24 ½Cystine					
			25 Méthionine					
			26 Isoleucine					
			27 Leucine					
			28 Norleucine					
			29 Tyrosine					
			30 Phénylalanine					
			31 β-Alanine					
			32 Ac β-aminobutyrique					
			33 Ac δ-aminobutyrique					
			34 Ethanolamine					
			35 Ammoniaque					
			36 Ornithine					
			37 Lysine					
			38 ε-Méthyllysine					
			39 Histidine					
			40 Inconnu					
			41 Inconnu					
			42 Arginine					

REMARQUES: _____

3.3.3. Analyse des hydrolysats

Les hydrolysats de culot ne contiennent que 18 AA au maximum. Leur cycle de chromatographie est de ce fait très court et il est avantageux d'utiliser un système avec changeur automatique d'échantillons. Le TSM peut contenir jusqu'à 40 échantillons différents et il est pourvu d'une série de sécurités qui permettent de le faire tourner sans surveillance pendant plusieurs jours.

3.3.3.1. Brève description de l'appareil TSM

Le système TSM, décrit par HRDINA (1968), ERTINGHAUSEN et ADLER (1969) ainsi que par ERTINGHAUSEN et coll. (1969) est basé sur des composantes semblables à celles du système NC-1, et nous décrirons uniquement les modules qui le distinguent de ce dernier :

- Le distributeur d'échantillons: un disque de deux fois 40 positions contient les échantillons fixés sur 50 µl de résine, dans des cartouches spéciales. Pour l'analyse, ces dernières se présentent de façon séquentielle aux deux colonnes d'élution.

- La périvalve et le programmateur: Le TSM travaille selon un gradient discontinu de tampons. Ainsi, l'autograde est remplacé par la périvalve qui est une valve multicanal, acceptant de façon séquentielle les solutions tampons, les réactifs et les solutions de rinçage. Elle actionne également 5 contacts électriques pour la mise en circuit de

divers modules. Une bande perforée du programmateur commande le cycle de 12 fois 16 positions différentes du module. Nous avons adopté le programme de VON ARX et coll. (1974), reproduit dans le tableau II.

- Les colonnes et la résine: Les AA acides et neutres sont élués par une colonne de 34 cm de long et 0,5 cm de diamètre interne; les AA basiques sont élués par une deuxième colonne de 8 x 0,4 cm. Les deux colonnes sont remplies de résine cationique, Technicon Chromobeads C_4, constituée de granules sphériques calibrées (8 - 10 µ).

- Les autres modules, tels que la pompe péristaltique P III, la cassette analytique et les 2 colorimètres sont ceux de l'AutoAnalyseur, déjà décrits pour la chaîne du "Digesteur continu".

3.3.3.2. Calcul des concentrations

Comme pour le système NC-1, le calcul des concentrations est basé sur la surface des pics.L'absorbance donnée par l'appareil TSM est linéarisée.Ainsi la surface se mesure par triangulation de la moitié supérieure du pic, à l'aide d'une petite règlette. La concentration se calcule - comme pour le système NC-1 - par rapport à un étalon (18 AA), mesuré dans les mêmes conditions. Nous avons cependant remarqué que pour les chromatogrammes d'une même série, il n'est pas indispensable d'introduire l'étalon interne dans les calculs, à condition de travailler avec le même lot de réactifs.

TABLEAU II

Programme de la périvalve (d'après VON ARX et coll. 1974)

TEMPS CUMULE (Min.)		4	24	32	34	66	69	92	100	104	108	115	132
TEMPS PARTIEL (Min.)		4	20	8	2	32	3	23	8	4	4	7	17
SUPPORT INITIAL		L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
SYST. ANAL. {ac.-ne. col.2	4	M	M	M	M	s	s	s	s	s	s	s	M
EVIER {ac.-ne. col.2	5	s	s	s	s	M	M	M	M	M	M	M	s
EVIER {basique col.1	6	s	M	M	M	s	s	s	s	s	s	s	M
SYST. ANAL. {basique col.1	7	M	s	s	s	M	M	M	M	M	M	M	s
POMPE 2 0,2N NaOH	8	M	M	M	M	M	M	M	M	s	s	M	M
pH 4,25	9	M	M	M	M	M	M	M	s	M	M	M	M
pH 4,25	10	M	M	M	M	M	s	s	M	M	M	M	M
pH 3,25	11	M	M	M	s	s	M	M	M	M	M	M	M
SUPPORT FIXE	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH 3,25	13	s	s	s	M	M	M	M	M	M	M	s	s
POMPE 1- 0,2N NaOH	14	M	M	M	M	M	M	M	M	M	s	M	M
pH 5,25	15	s	s	s	s	s	s	s	s	s	M	s	s
RETOUR (H_2O+Brij1%)	16	M	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
SYST. ANAL. (id.)	17	s	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
CANAL LIBRE	18	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
SYST. ANAL. {50%de M-Cell.	19	s	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
SYST.ANAL.,Ninhydr.	20	M	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
SUPPORT TERMINAL		L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
CONTACT 1, POMPE 1		L	s	s	s	L	L	L	L	s	s	s	s
CONTACT 2, POMPE 2		L	L	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
CONTACT 3 {Distribut. d'échant.		s	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
CONTACT 4 SECURITE		L	L	L	s	L	L	L	L	L	L	s	L
CONTACT 5 PERIVALVE		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
No. DE ROULEAU		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

s: anneau petit ("small") M: anneau moyen ("medium") L: anneau grand ("large")

3.3.3.3. Chromatogramme-étalon

Nous utilisons la solution-étalon Technicon pour hydrolysats, contenant 18 AA à une concentration de 2,5 µM/ml chacun. Comme on le voit dans la figure 12, la séparation ne pose aucun problème.

FIGURE 12

Chromatogramme-étalon pour hydrolysats de protéines.

Charge :

10 µl d'un mélange de 18 acides aminés (2,5 µM/ml) ;

Etalon interne :

10 µl de norleucine (2,5 µM/ml).

CHAPITRE II

ETUDE DE NOS CONDITIONS DE TRAVAIL

1. EXTRACTION

1.1. Nombre d'extractions et rendement

Plusieurs auteurs (BOULTER 1966; LAWRENCE et coll. 1959) ont déterminé le rendement des extractions successives de l'azote α-aminé ou de l'azote total dans le matériel végétal. Pour ce faire, ils ont constitué un pool de matériel qui a été subdivisé en une série de parties aliquotes, chacune extraite de 1 à 6 ou 7 fois. D'après les valeurs inscrites au tableau III, ce nombre maximum d'extractions est largement suffisant pour épuiser le matériel en azote extractible. Pour chaque aliquote les extraits sont réunis et les teneurs en azote, cumulées, mesurées. Les résultats sont exprimés en % par rapport à la valeur maximale extraite.

Nous sommes partis d'une culture d'environ 300 racines de Lentille (36 ± 2 mm), subdivisée en 5 lots qui ont été pesés et extraits resp. 1-2-3-4-5 fois à l'éthanol 70%. Sur chaque lot l'azote total a été mesuré, exprimé en % et porté dans le tableau III. Ce dernier permet une comparaison entre nos valeurs et celles des auteurs ci-dessus, bien que ces valeurs proviennent de matériel et de conditions d'extraction quelque peu différentes. Il en résulte que :

TABLEAU III

Comparaison des rendements d'extraction de l'azote (N) de différents matériels végétaux

Nombre d'extractions	Rendements en % de la valeur maximale			
	N total (rac. de Lentille) (1)	N total (tiges de Pois) (2)	N α-aminé (tiges de Pois) (2)	N α-aminé (farine de Haricot) (3)
1	65,6	66,0	64,0	44,0
2	79,4	91,0	86,0	77,2
3	84,4	97,0	98,0	86,9
4	96,2	98,7	99,3	92,7
5	100	99,0	99,7	96,6
6	—	99,5	99,9	100
7	—	100	100	—

Conditions d'extraction :

(1) : 70 % d'éthanol; durée d'une extraction, 5 min; température du laboratoire.

(2) : 70 % d'éthanol; durée d'une extraction, 6 h ; température du laboratoire.

(D'après LAWRENCE et coll. 1959)

(3) : 0,01 M tampon phosphate à pH 7,00; durée d'une extraction, 30 min; à 60 °C.

(Adapté de BOULTER 1966)

1) les valeurs de l'azote total extrait sont comparables à celles de l'azote α-aminé extrait par le même solvant. La mesure de l'azote total constitue donc un critère acceptable pour la détermination du rendement d'extraction des AA;

2) la comparaison des deux premières colonnes qui traitent de matériel semblable extrait par le même solvant pendant des durées très différentes, montre que le rendement d'une extraction de 6 h n'est en moyenne que d'environ 10% supérieure à l'extraction correspondante de 5 min. Il semble donc que l'extraction ait lieu surtout pendant les premières minutes et qu'ensuite un équilibre s'établisse progressivement entre l'azote extrait et le non extrait;

3) les rendements des premières extractions au tampon phosphate sont nettement moins élevés que ceux à l'éthanol;

4) la courbe d'extraction suit une allure asymptotique. Celle-ci a également été mise en évidence par HANCOCK (1958) pour l'extraction des AA de microorganismes par différents solvants dont l'éthanol à 25%. Pour ce solvant utilisé en grand excès, l'auteur obtient une extraction complète après 10 à 15 min;

5) après quatre extractions à l'éthanol, nous atteignons un rendement de plus de 96%, ce qui nous a fait limiter le nombre d'extractions à cinq.

1.2. Pertes durant l'extraction

1.2.1. Mesure par addition de norleucine

Pour mesurer les pertes durant l'extraction nous ajoutons au broyat des racines une quantité connue de norleucine qui subira toutes les étapes de l'extraction, y compris les transvasements des différents extraits après centrifugation, l'évaporation à sec, la redissolution du résidu suivie de l'ultrafiltration et de l'analyse par chromatographie. Les résultats des essais doubles sont reportés dans le tableau IV. Avant et après la série des 5 chromatogrammes des extraits, nous avons passé un chromatogramme-étalon chargé de la même quantité de norleucine que les broyats. La comparaison entre les pics de norleucine des étalons (100%) et ceux des extraits donne le pourcentage de récupération dont on déduit celui des pertes.

La récupération moyenne de 89,84% correspond à une perte importante de 10,16%. Nous pensons qu'elle n'est pas due à des décompositions de la molécule au cours des opérations, mais plutôt à des absorptions au culot insoluble et à une redissolution incomplète après l'évaporation à sec.

1.2.2. Mesure par la minéralisation des racines intactes

Nous avons effectué un autre test de pertes d'azote durant les manipulations. En effet, il est possible de comparer la somme des teneurs en azote total de l'extrait et de l'hydrolysat de racines de Lentille (18 mm) avec une mesure de l'azote total de matériel similaire, directement broyé et minéralisé par la chaîne du "Digesteur continu" (décrite au chapitre I.B.3.2.1.), précédée d'un module qui broie les

TABLEAU IV

Rendement de l'extraction calculé par la récupération de norleucine ajoutée aux broyats (série 1 et 2)

Extraits de racines de Maïs (fractions)	Surface du pic de norleucine		% de norleucine récupérée (*)	
	série 1	série 2	série 1	série 2
mm 0 - 2	1,59	1,58	91,9	91,3
2 - 4	1,62	1,54	93,6	89,0
4 - 6	1,48	1,66	85,6	96,0
6 - 8	1,60	1,56	92,5	90,2
8 - 10	1,48	1,43	85,6	82,7
Moyenne des étalons	1,73		--	

Rendement moyen de l'extraction : 89,84 %

Pertes durant l'extraction : 100 - 89,84 = 10,16 %

(*) : $\frac{100 \times (\text{Surface du pic Nle})}{1,73}$

TABLEAU V

Rendement de l'extraction calculé par la minéralisation de racines intactes

Azote total obtenu après le broyage de racines intactes : 5,14 mg / 100 mg PS

Azote total obtenu par addition des teneurs de l'extrait et de l'hydrolysat : 4,52 mg / 100 mg PS

Rendement moyen des opérations d'extraction et d'hydrolyse : $\frac{100 \times 4,62}{5,14}$ = 87,94 %

Pertes durant l'extraction et l'hydrolyse : 100-87,94 = 12,06 %

échantillons solides, le "Solid prep sampler II". Ce dernier test exclut donc les manipulations de l'extraction et celles de l'hydrolyse. Les résultats comparatifs qui figurent dans le tableau V montrent une perte totale de 12,06%. En comparant cette valeur aux pertes de 10,16% de l'extraction, on peut déduire qu'environ 5/6 de la perte totale se réalisent au cours de l'extraction, contre environ 1/6 pendant les opérations d'hydrolyse, où les quantités absolues d'azote sont d'ailleurs moindres.

1.3. Reproductibilité de l'extraction

A partir des valeurs du tableau IV, il est facile de calculer la reproductibilité de l'extraction. Celle-ci exclut les variations parfois importantes du matériel, mais elle tient compte de toutes les manipulations de l'extraction (extr) et aussi des variations de l'analyse chromatographique (chrom).

D'après les surfaces du pic de la norleucine (Tab IV), on calcule :

$\bar{x} = 1,554$		$\bar{x}$, moyenne des valeurs;
$s = 0,0717$		s, déviation standard;
$CV = 4,61$ %		CV, coefficient de variation.

On a : $CV_{total} = \sqrt{(CV)^2_{extr} + (CV)^2_{chrom}}$ (GOLDSTEIN 1967)

Connaissant $CV_{total} = 4,61$ et $CV_{chrom} = 4,07$,

on peut déduire: $CV_{extr} = \sqrt{4,61^2 - 4,07^2} = 2,17$ %

2. HYDROLYSE

2.1. Durée optimale

La durée d'hydrolyse est variable et selon les auteurs, elle se situe généralement entre 24 et 48 h. Le temps constitue en effet un compromis: certains AA sont libérés après 20 h et commencent ensuite à se dégrader, alors que d'autres ne sont libérés que beaucoup plus tard et demandent par conséquent un temps d'hydrolyse plus long (HIRS et coll. 1954; SMITH et coll. 1954; DER TERROSSIAN et coll. 1966; JOLLES et coll. 1972). Comme les durées optimales dépendent également du matériel utilisé (HILL 1965), nous avons préparé un pool de racines de Lentille qui a été soumis à des hydrolyses de resp. 24-32-40-48-72 et 96 h. Les valeurs relatives des concentrations ont été portées dans les figures 13 (A et B). Ces dernières montrent que les teneurs maximales de tous les AA se retrouvent après une durée d'hydrolyse comprise entre 24 et 48 h. Exception faite pour le pic de l'ammoniaque qui ne cesse de croître en raison de la dégradation continue de certains AA. Cette observation confirme celle de SMITH et coll. (1954) qui trouvent une proportionalité directe entre l'accroissement du pic d'NH_3 et la dégradation de la sérine et de la thréonine. Cette relation n'entre en jeu que lorsque les amides protéiniques sont complètement oxydés en leurs AA correspondants.

Concernant la mesure des AA de notre matériel, les valeurs maximales sont atteintes après 24 h pour l'acide aspartique, la thréonine, la sérine et l'arginine; après 32 h pour la méthionine et l'histidine ;après 40 h pour l'acide glutamique, la proline, la valine, l'alanine, la leucine, la phénylalanine, la tyrosine et la lysine; après 48 h pour la glycine et l'isoleucine. Cet ordre de libération correspond en général à celui établi par HILL (1965) sur différentes protéines.

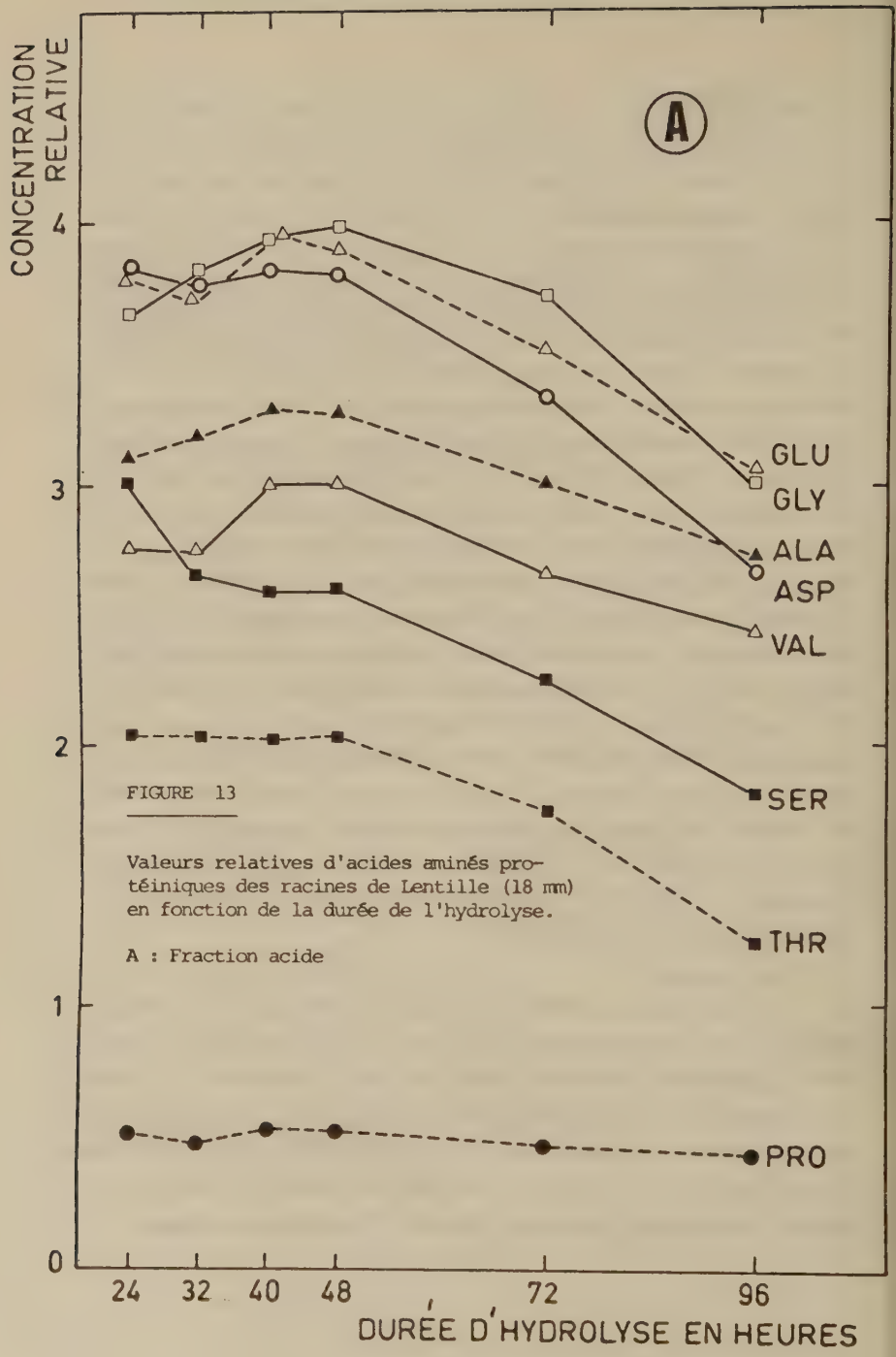


FIGURE 13

Valeurs relatives d'acides aminés protéiniques des racines de Lentille (18 mm) en fonction de la durée de l'hydrolyse.

A : Fraction acide

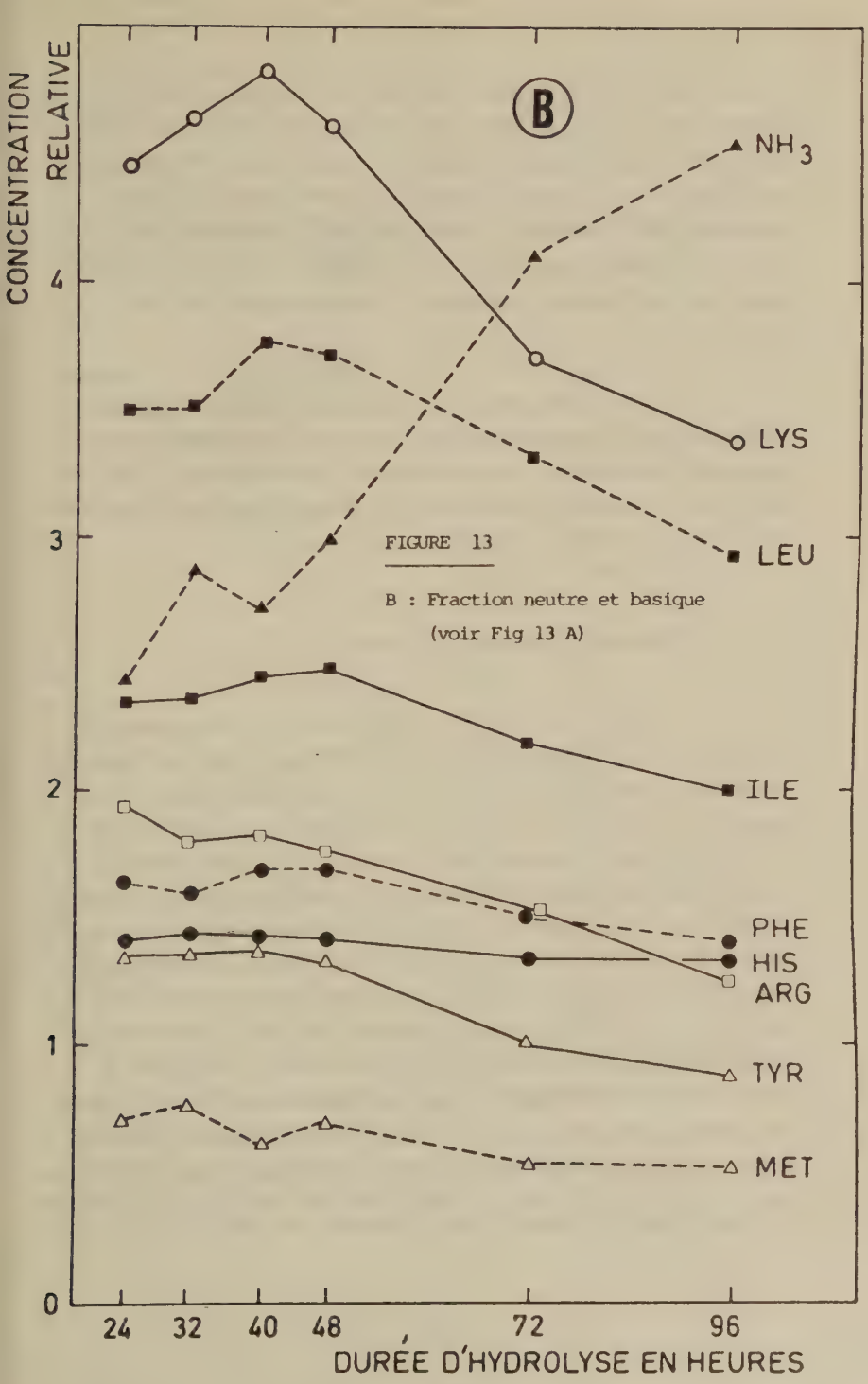


FIGURE 13

B : Fraction neutre et basique
(voir Fig 13 A)

A partir de 72 h la diminution est très forte pour tous les AA. Théoriquement nous pourrions choisir la durée de 40 h où nous obtenons le plus grand nombre de maximums, mais comme dans la littérature concernant le matériel végétal les durées sont en général limitées à 24 h (CLARKE et ELLINGER 1967; MOSSE et BAUDET 1969; AUGIER et PELLEGRINI 1972) ou à 32 h (LINSER et coll. 1966), nous avons opté pour le compromis de 30 h d'hydrolyse pour tous nos culots.

Suite à la dégradation initiale importante de la sérine, nous procédons à une correction pour cet AA par extrapolation de la courbe de dégradation à 0 h. Par la suite, toutes les valeurs de la sérine seront ainsi majorées de 18,5%. Les variations des autres AA, moins significatives, ne seront pas corrigées.

2.2. Influence du matériel glucidique

SCHRAMM et coll. (1953), DUSTIN et coll. (1953) ainsi que LINSER et coll. (1966) citent une interférence possible des hydrates de carbone dans le matériel à hydrolyser. Ainsi nous avons, comme ces auteurs, ajouté à des étalons d'AA une quantité d'amidon égale à 100 fois la teneur en azote. Ces étalons, chargés ou non d'amidon, ont alors été hydrolysés et analysés de façon habituelle par chromatographie. Les concentrations des différents AA obtenus figurent dans le tableau VI, qui comporte également les différences en pourcents entre l'étalon non hydrolysé et l'étalon hydrolysé, respectivement avec et sans amidon. La comparaison entre l'étalon non hydrolysé et hydrolysé montre un accroissement très fort de l'ammoniaque au détriment de la cystéine, de la méthionine, et, dans une moindre mesure, de la sérine, de la thréonine et de la tyrosine. L'adjonction d'amidon à l'étalon d'AA provoque une augmentation de toutes les valeurs (sauf celle de la

TABLEAU VI

Variation des acides aminés d'un étalon soumis à l'hydrolyse en présence et en absence d'amidon

Composés	Concentration dans l'étalon (µM / ml)	% (1)	% (2)	% (3)
Asp	1,25	- 8,5	+ 2,4	+ 11,9
Thr	"	- 19,4	- 15,1	+ 5,4
Ser	"	- 20,5	- 20,5	± 0
Glu	"	- 12,3	- 4,9	+ 8,5
Pro	"	+ 2,2	+ 2,2	± 0
Gly	"	- 10,8	- 13,7	+ 5,6
Ala	"	+ 1,5	+ 4,4	+ 2,9
Val	"	- 2,6	+ 4,1	+ 6,8
Met	"	- 27,3	- 46,6	- 26,6
Ile	"	- 1,4	+ 2,8	+ 4,2
Leu	"	- 0,4	- 0,4	± 0
Tyr	"	- 7,7	- 3,2	+ 4,9
Phe	"	- 5,0	- 2,3	+ 2,9
Lys	"	+ 0,4	+ 1,6	+ 1,2
His	"	- 4,9	+ 8,1	+ 13,6
NH_3	"	+ 236,3	+ 333,8	+ 29,0
Arg	"	- 13,9	- 8,2	+ 6,5

(1): % = 10^2. (Etalon hydrolysé - Etalon non hydrolysé) /Etalon n. hy.

(2): % = 10^2. (Et.hy. en prés. d'amidon - Et.n.hy.) /Et.n.hy.

(3): % = 10^2. (Et.hy. en prés. d'amidon - Et.hy.) /Et.hy.

Notons que la cystéine, également présente dans l'étalon, diminue jusqu'à l'état de traces non mesurables après chacune des hydrolyses.

méthionine qui diminue de 26%). Cette augmentation est variable et sa moyenne est de 4,52%. Les auteurs ci-dessus trouvent une augmentation de l'ordre de 3%. D'après eux, elle pourrait provenir d'impuretés de l'amidon contenant des traces de matériel protéinique et surtout de l'ammoniaque. Ils citent également la présence possible de pics de monosaccharides dans le chromatogramme d'AA. Ces monosaccharides libérés par hydrolyse de l'amidon, peuvent passer à travers la colonne et donner une coloration rouge avec la ninhydrine, ce qui donne de nouveaux pics, ou une augmentation des pics d'AA ayant le même temps d'élution.

3. MINERALISATION

3.1. Minéralisation par le "Digesteur continu"

Cette chaîne décrite au chapitre I.B.3.2.1., a analysé l'azote total ainsi que le phosphore total de la plus grande partie de nos échantillons. Comme le jeu des tubes a été modifié pour l'analyse de nos échantillons, une série de tests sur des étalons ou sur du matériel végétal nous ont parus intéressants avant d'entamer les séries d'analyse proprement dites.

3.1.1. Comparaison entre les résultats de la méthode manuelle, semi-automatique et automatique

Pour de nombreuses graines différentes, GEHRKE et coll. (1972 et 1973) ont largement comparé les teneurs en azote total obtenues par la chaîne du "Digesteur continu" et la méthode manuelle

de Kjeldahl-Parnas, utilisée dans plusieurs laboratoires différents. D'autres travaux rapportent des mesures comparatives sur la viande (WEBER 1973) ou sur les engrais (GEHRKE et coll. 1971). En général, ces auteurs trouvent une bonne corrélation entre les deux méthodes.

Nous avons effectué des comparaisons à partir d'extraits éthanoliques de racines de Lentille (36 mm), dont nous avons mesuré l'azote total selon 3 méthodes différentes:

1) la minéralisation manuelle selon Kjeldahl, suivie de la titration de l'NH_3 libéré;

2) la minéralisation par le "Block digestor", suivie de la détermination colorimétrique de l'NH_4^+ dans l'AutoAnalyseur, (décrit au chapitre I.B.3.2.2.);

3) la minéralisation et la détermination colorimétrique par la chaîne du "Digesteur continu".

Chaque analyse a été effectuée 4 fois et nous avons comparé les valeurs moyennes entre elles. Les résultats figurent dans le tableau VII. Comme on pouvait s'y attendre, la méthode manuelle donne les valeurs les plus élevées. La minéralisation y est en effet beaucoup plus longue et nous pouvons la considérer comme étant complète. Le "Digesteur continu" donne également un rendement proche de 100% sur ce matériel facile à minéraliser. Pour le "Block digestor" on pouvait s'attendre à un rendement plus élevé que 97%; la perte ne semble cependant pas due à une minéralisation incomplète, mais plutôt à des pertes de transvasements, voire à des éclaboussures que nous avons parfois observés dans le "Block digestor". On peut cependant conclure que l'exactitude des méthodes automatisées est très bonne.

TABLEAU VII

Valeurs en azote total d'un extrait de racines de Lentille (36 mm), mesuré selon trois méthodes différentes

Mesures	Valeurs en azote total (ppm)		
	Méthode manuelle	"Block digestor"	"Digesteur continu"
1e.	1.060	1.046	1.058
2e.	1.115	1.041	1.068
3e.	1.085	1.039	1.094
4e.	1.026	1.035	1.056
Moyennes	1.072	1.040	1.069
% de N récupéré	100	97,01	99,72

3.1.2. Linéarité

Pour vérifier la linéarité de la loi de Beer-Lambert dans notre zone de valeurs, nous avons progressivement dilué un pool concentré d'extraits de racines de Lentille. Les analyses d'azote total ont ensuite été effectuées sur le "Digesteur continu" dont les résultats sont notés dans la figure 14. Tous les points expérimentaux sont sur une droite, ce qui prouve que pour notre gamme de mesure de 0 à 1100 ppm, la loi de Beer-Lambert est parfaitement applicable.

3.1.3. Reproductibilité

Au début des séries d'analyse, et à des intervalles réguliers après 15 ou 20 échantillons, nous avons inséré pour contrôle des godets d'eau ainsi que des étalons de 250 ppm de gélatine en solution. Il est intéressant de grouper les résultats des étalons dans un tableau (VIII) et d'en calculer la reproductibilité étalée sur deux jours.

Le coefficient de variation trouvé n'est que de 1,28 %, ce qui est comparable à ceux des auteurs cités ci-dessus (WEBER 1973; GEHRKE et coll. 1972 et 1973), qui calculent respectivement 1,66 et des valeurs entre 0,28 et 1,85 % suivant le matériel.

3.1.4. Contamination

Une des limites possible de la technique du flux continu réside dans le danger de contamination d'un échantillon par l'autre (HRDINA 1968; ERTINGHAUSEN et coll. 1969). Ainsi, un échantillon de faible concentration pourrait, par son passage à travers le système

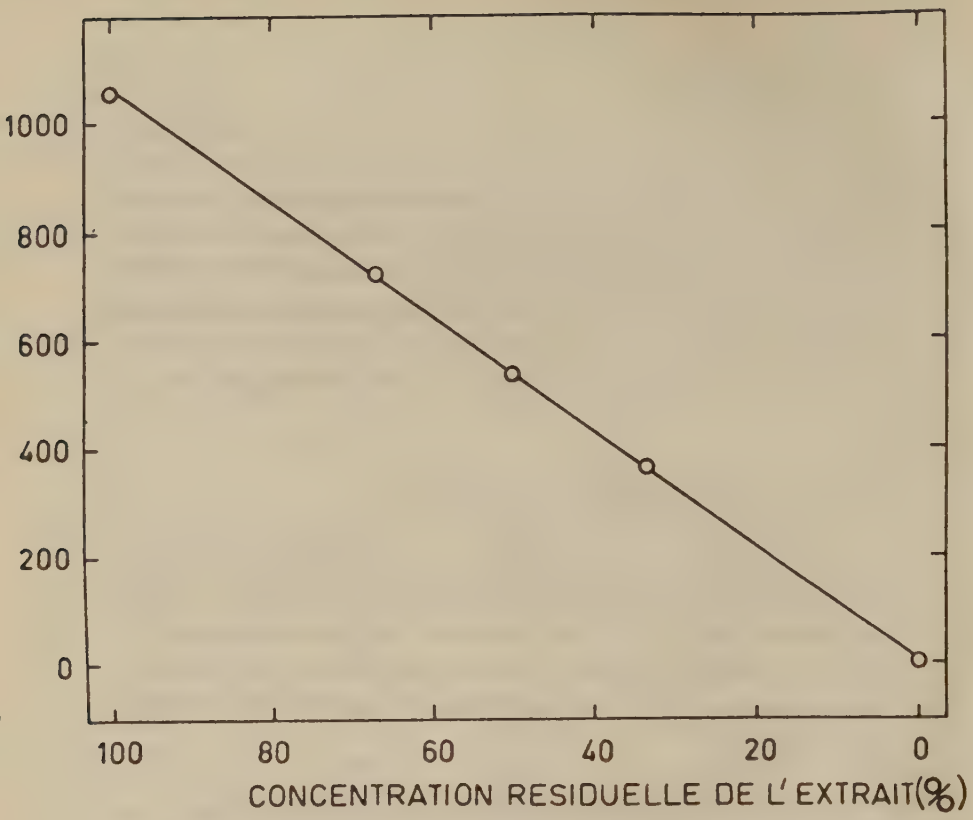


FIGURE 14

Vérification de la linéarité du "Digesteur continu", par la mesure de l'azote total d'un extrait de racines de Lentille en fonction de la dilution.

TABLEAU VIII

Reproductibilité de la mesure de l'azote total d'étalons de gélatine, par le "Digesteur continu"

Mesures de l'azote total

Résultats du 1er jour		Résultats du 2e jour			
250	253	249	250	252	252
253	256	250	250	251	
253	255	255	249	254	
251	254	250	245	247	
255	256	250	247	247	

$\bar{x}$ = 251,4

s = 3,13

CV = 1,28 %

d'analyse, être responsable d'une partielle dilution de l'échantillon suivant (contamination négative); inversément, un échantillon très concentré pourrait augmenter le résultat du suivant (contamination positive). Ce danger de contamination augmente avec la longueur du circuit la cadence d'analyse, la brièveté du rinçage entre deux échantillons, la viscosité des liquides en présence et la différence de concentrations entre deux échantillons successifs.

Pour vérifier la contamination au cours de nos analyses en série, nous avons inséré périodiquement après un échantillon donné, x_o, une paire de godets x_1 et x_2 contenant la même quantité d'azote ou de phosphore.

Lorsque $x_0 \gg x_1$, il y a danger de contamination positive qui se manifeste par $x_1 > x_2$;
alors que pour $x_0 \ll x_1$, il y a danger de contamination négative qui se manifeste par $x_1 < x_2$.

Pour exprimer la contamination en %, nous avons établi la formule suivante :

$$\% \text{ de contamination} = 100 \left(1 - \frac{x_1 - x_0}{x_2 - x_0} \right)$$

Elle présente l'avantage d'être en fait indépendante des écarts absolus entre x_0 et x_1, respectivement x_2 qui interviennent sous forme d'un rapport.

Les valeurs mesurées indifféremment pour le dosage de l'azote et du phosphore, ainsi que les calculs figurent dans les tableaux IX et X. Les contaminations calculées sont toutes inférieures à 1%, ce qui est très peu pour un trajet d'analyse aussi long. Pratiquement, cela

TABLEAU IX

Mesure de la contamination positive entre des échantillons successifs du "Digesteur continu"

	x_0	x_1	x_2
Mesure de l'azote	200,0	0,0	1,0
total (ppm)	197,0	0,0	0,0
	578,0	7,5	5,0
	561,0	6,5	5,0
	527,0	0,5	0,0
	560,0	0,5	0,0
	500,0	33,0	30,0
Moyennes ($\bar{x}$)	446,14	6,86	5,86

Pourcentage de contamination: $100 \left(1 - \frac{x_1 - x_0}{x_2 - x_0}\right) = 0,23$ %

	x_0	x_1	x_2
Mesure du phosphore	39,5	0,0	0,0
total (ppm)	60,0	0,0	0,0
	127,0	6,0	4,5
	980,0	26,0	18,0
	700,0	18,0	14,0
	120,0	17,0	16,0
	195,0	7,0	7,0
Moyennes ($\bar{x}$)	317,36	10,57	8,5

Pourcentage de contamination: 0,67 %

TABLEAU IX (suite)

x_0, x_1, x_2 : trois échantillons d'une série d'analyses qui se suivent immédiatement et dans l'ordre,

x_0 est un échantillon quelconque,

x_1 et x_2 représentent une paire d'échantillons connus qui ont une teneur identique en azote et en phosphore.

TABLEAU X

Mesure de la contamination négative entre des échantillons successifs du "Digesteur continu"

	x_0	x_1	x_2
Mesure de l'azote total (ppm)	1,0	247,0	252,0
	0,0	247,0	252,0
	49,0	239,0	238,0
	3,0	254,0	256,0
	0,0	561,0	562,0
	0,0	211,0	212,0
	212,0	265,0	268,0
	389,0	577,0	578,0
Moyennes (x)	81,75	325,13	327,25
Pourcentage de contamination : 0,86 %			

	x_0	x_1	x_2
Mesure du phosphore total (ppm)	0,0	50,0	50,0
	0,0	50,0	50,0
	4,5	51,0	51,0
	4,5	140,0	146,0
	0,0	400,0	402,0
	405,0	891,0	890,0
Moyennes (x)	82,8	316,40	317,80
Pourcentage de contamination : 0,60 %			

Légende : voir TABLEAU IX.

signifie que pour nos conditions d'analyse, l'interférence entre deux échantillons successifs de concentrations fort différentes est négligeable et qu'il n'est pas nécessaire de repasser les échantillons dans un autre ordre.

3.2. Minéralisation par le "Block digestor"

Une partie de nos échantillons a été analysée pour l'azote total sur ce système décrit au chapitre I.B.3.2.2.. Comme pour le "Digesteur continu", nous avons commencé par tester ce système sur des étalons ou sur le matériel végétal disponible. Notons que la comparaison avec le "Digesteur continu" et la méthode manuelle a déjà été faite dans le tableau VII.

3.2.1. Détermination de la durée optimale d'hydrolyse

Pour la technique manuelle de Kjeldahl on admet en principe que la minéralisation est terminée lorsque la solution devient limpide. Pour toute sécurité, on maintient encore l'échantillon dans les conditions d'hydrolyse pendant environ 20 min supplémentaires avant de procéder aux mesures de l'azote minéralisé. En vue de déterminer le temps nécessaire pour une hydrolyse complète, nous avons choisi la farine d'arachide, matériel disponible en grandes quantités et difficilement minéralisable. Des échantillons doubles ont été pesés et ensuite minéralisés pendant des durées entre 20 et 70 min dans le "Block digestor" à 300 ^{o}C. L'azote total libéré a ensuite été déterminé sur l'Auto-Analyseur dont les résultats sont repris dans le tableau XI. D'après ce dernier, trois constatations se dégagent essentiellement :

TABLEAU XI

Etude de la minéralisation d'échantillons de farine d'arachide par le "Block digestor" en fonction du temps

Durée de minéralisation (minutes)	Poids initial (mg)	Résultats (% d'N)	Moyennes (% d'N)	Rendements en % de la valeur max.
20	504,9	8,645	8,67	98,41
"	518,3	8,697		
25	505,5	8,665	8,69	98,64
"	509,0	8,723		
30	505,4	8,711	8,74	99,21
"	525,6	8,776		
35	526,3	8,793	8,81	100,00
"	503,1	8,825		
40	501,6	8,822	8,77	99,55
"	5o7,2	8,718		
50	519,3	8,723	8,74	99,21
"	510,9	8,735		
60	510,0	8,750	8,61	97,73
"	502,4	8,793		
70	523,4	8,426	8,20	93,08
"	504,3	8,135		

N : azote

1) après 20 min déjà, plus de 98% de l'azote est minéralisé;

2) l'optimum se situe entre 30 et 50 min où les résultats sont très semblables et où la récupération est de plus de 99% par rapport au maximum observé après 35 min;

3) à partir de 60 min et plus, les résultats baissent assez rapidement. L'évaporation d'ammoniaque étant exclue en ce milieu fortement acide, nous n'avons pas d'explication pour cette diminution, sinon qu'il y aurait des pertes par éclaboussures en cas d'ébullition prolongée.

3.2.2. Linéarité, contamination

Nous n'avons pas jugé utile de contrôler ici la linéarité et la contamination comme sur la chaîne du "Digesteur continu". Comme nous l'avons signalé plus haut, la contamination dépend de la longueur du trajet d'analyse, qui est nettement plus court ici. Il se limite en effet à la deuxième partie de la chaîne du "Digesteur continu". Nous pouvons en conclure que dans ce cas, la contamination est également négligeable. Concernant la linéarité, la réaction de détection de l'NH_4^+ libéré est identique à celle du "Digesteur continu" qui répondait à la loi de Beer-Lambert.

Pour toute documentation, nous reproduisons à la figure 15 un tracé de la ligne de base et de trois étalons différents, qui donne un aperçu de la linéarité et de non-contamination.

3.2.3. Reproductibilité

En vue de tester la reproductibilité de ce système, nous avons

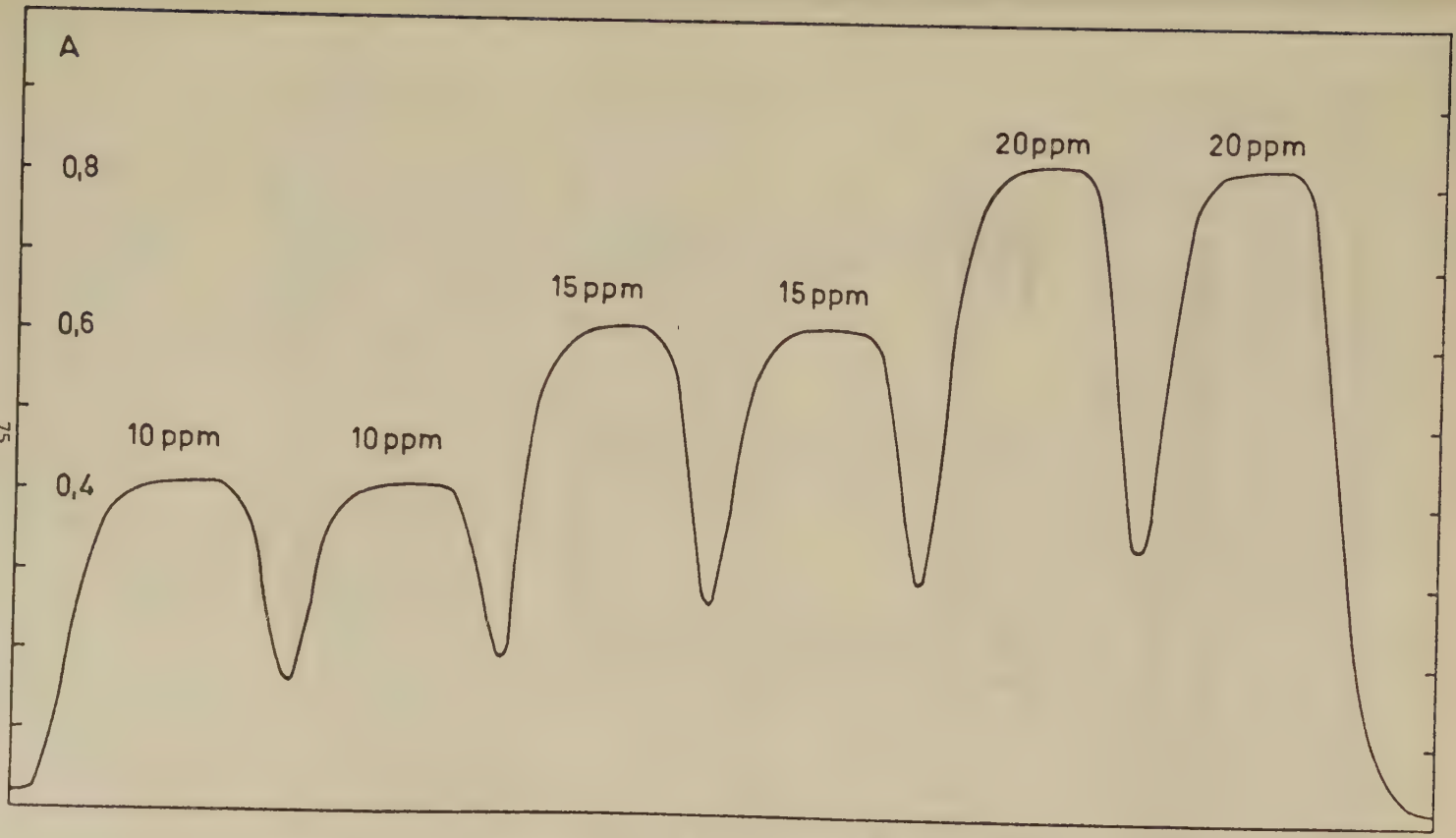


FIGURE 15

Tracé original par l'AutoAnalyseur de l'absorbance (A) d'étalons doubles d'azote, après leur minéralisation dans le "Block digestor".

TABLEAU XII

Reproductibilité de la mesure de l'azote total (N) d'étalons de gélatine, par le "Block digestor"

Poids initial (mg)	Résultats (% d'N)	Poids initial (mg)	Résultats (% d'N)
100,77	15,75	100,40	16,01
100,06	15,69	100,55	16,01
100,70	15,69	100,09	15,74
100,77	15,73	100,20	15,75
100,15	15,69	100,12	15,71
100,41	15,69	100,08	15,71
100,35	15,55	100,43	15,56
100,05	15,55	100,21	15,71
100,12	15,48	100,09	15,55
100,69	15,84	100,45	15,56

$\bar{x}$ = 15,699

s = 0,141

CV = 0,895 %

analysé 20 fois notre étalon de mesure (gelatine). Pour chaque échantillon nous avons pesé environ 1 g de matière solide qui a été analysée ensuite selon les conditions ci-dessus. Les poids ainsi que les résultats sont portés dans le tableau XII. Toutes les valeurs sont situées entre 15,48 et 16,01 % d'azote. Le calcul du coefficient de variation donne 0,89 %, ce qui représente une reproductibilité excellente. Elle rejoint celle égale à 0,95 % que l'on peut établir d'après les récents essais de WALL et coll. (1975) sur 20 composés alimentaires différents.

4. CHROMATOGRAMMES-TYPE DE RACINES DE LENTILLE

4.1. Introduction

Bien qu'au cours de ce travail les racines soient soumises à des conditions de croissance et à des traitements très différents, l'image-type des chromatogrammes d'AA sera toujours la même pour un matériel donné. Ni pour la Lentille, ni pour le Maïs, il n'y aura apparition ou disparition de pics à la suite des différents traitements. Seules les concentrations sont sujettes à des variations.

Rappelons aussi que nos jeunes plantes sont étiolées et que les travaux consultés à ce sujet rapportent tous une augmentation générale de la teneur en AA libres (VIRTANEN et MIETTINEN 1953) et une diminution simultanée de celle des AA protéinique, pour la culture à l'obscurité par rapport à celle qui est éclairée (NANDI 1958; ARONOFF 1962; STEWARD et coll. 1962). De plus, le maintien de la culture à l'obscurité empêche les importantes fluctuations de concentration durant le cycle diurne (STEWARD et DURZAN 1965; CARR et PATE 1967).

4.2. Chromatogramme-type des acides aminés libres

L'extrait éthanolique de notre matériel de référence, les racines de Lentille (18 mm), a été analysé sur le système NC-1 décrit. Le chromatogramme des substances positives à la ninhydrine qui en résulte est très chargé et ne comporte pas moins de 42 pics différents dont 30 sont identifiés comme étant des AA, 7 sont des peptides, 4 sont inconnus ou pas sûrs et 1 représente la norleucine ajoutée en tant qu'étalon interne. Le chromatogramme est représenté à la figure 16 dont nous passons en revue ci-dessous tous les pics connus ou inconnus dans leur ordre d'élution. Les concentrations des AA figurent dans le tableau XIII et les valeurs inscrites représentent les résultats moyens de cinq cultures différentes dont nous avons calculé les écarts possibles pour P = 0,05.

- Pics no. 1 et no. 2 :

  Ces deux substances inconnus s'intercalent entre les pics de l'acide cystéique et la phosphoéthanolamine de l'étalon, sans y être identiques; une surcharge de la phosphosérine donne un pic avant ou sur l'acide cystéique. Certains auteurs signalent que des dérivés de l'acide cystéique apparaissent également dans cette zone du chromatogramme : il s'agit de l'acide homocystéique (VAN SANDE et coll. 1970) et de l'acide cystéine sulfinique (PURDIE 1966) que nous n'avons pas surchargés. Plus précisément dans les plantes supérieures, FOWDEN (1964) confirme la présence de nombreux dérivés de la cystéine. Notons en faveur de cette thèse qu'après une hydrolyse partielle de 2 h, les pics no.1 et no. 2 sont pratiquement réduits à zéro, avec une augmentation suséquente de la teneur en acide cystéique.

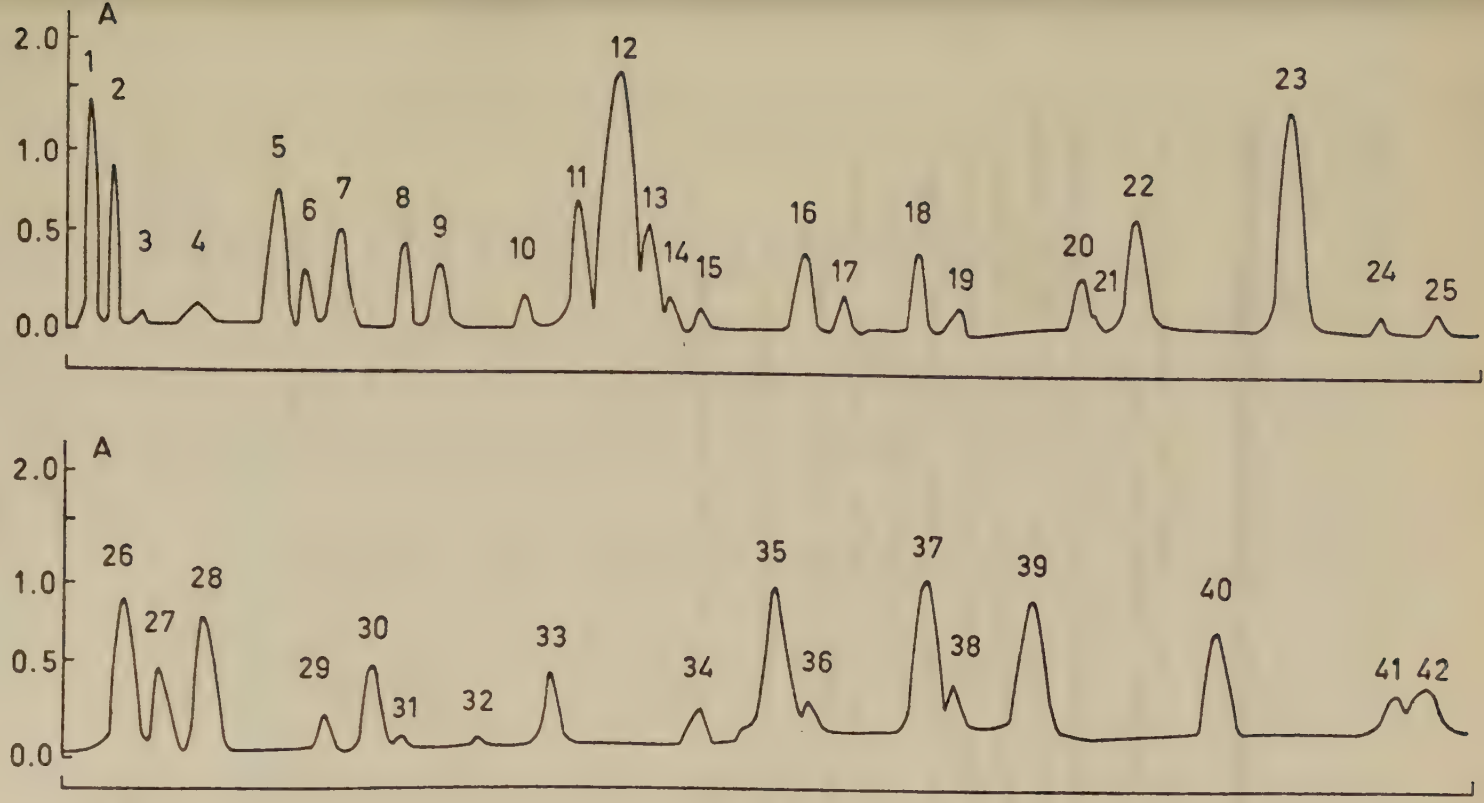

A
2.0
1.0
0.5
0.0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
A
2.0
1.0
0.5
0.0
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

FIGURE 16

FIGURE 16

Chromatogramme-type des acides aminés libres de racines de Lentille (18 mm)

Charge : 100 µl, ce qui correspond à 2 mg de matériel sec; 50 µl de Norleucine à 2,5 µM/ml (étalon interne).

3.Urée - 8.Sulfoxyde de méthionine - 9.Méthionine sulfone - 10.Acide aspartique - 11.Thréonine - 12.Asparagine - 13. Sérine - 14.Glutamine - 18.Acide glutamique - 19.Proline - 20.Glycine - 21.Glutathion réduit - 22.Alanine - 23.Valine - 24.½Cystine - 25.Méthionine - 26. Isoleucine - 27.Leucine - 28.Norleucine - 29.Tyrosine - 30.Phénylalanine - 31. β-Alanine - 32.Acide β-aminobutyrique - 33.Acide γ-aminobutyrique - 34.Ethanolamine - 35.Ammoniaque - 36.Ornithine - 37.Lysine - 38. ε-Méthyllysine - 39.Histidine - 42.Arginine.

1, 2, 40, 41, pics inconnus réagissant à la ninhydrine

4, 5, 6, 7, 15, 16, 17, peptides extractibles à l'éthanol.

TABLEAU XIII

Teneurs en acides aminés libres de racines de Lentille (18 mm)

No. du pic	Composé	µM/ 100 mg PS	No. du pic	Composé	µM/ 100 mg PS
1	*	1,10 ± 0,44**	22	Ala	1,01 ± 0,08
2	*	0,58 ± 0,10	23	Val	4,29 ± 0,29
3	Urée	traces	24	V2Cys	traces
4	Pept.	2,94 ± 0,47	25	Met	traces
5	Pept.	3,04 ± 0,17	26	Ile	2,22 ± 0,22
6	Pept.	0,84 ± 0,23	27	Leu	1,15 ± 0,09
7	Pept.	1,29 ± 0,90	28	Nle	étalon int.
8	MetSO	1,40 ± 0,45	29	Tyr	0,34 ± 0,06
9	$MetSO_2$	1,74 ± 0,67	30	Phe	1,65 ± 0,13
10	Asp	0,23 ± 0,02	31	β-Ala	traces
11	Thr	3,86 ± 0,43	32	β-Abu	traces
12	Asn	22,18 ± 3,19	33	γ-Abu	0,44 ± 0,04
13	Ser	2,59 ± 0,40	34	$EtNH_2$	0,88 ± 0,16
14	Gln	traces	35	NH_3	1,00 ± 0,18
15	Pept.	0,72 ± 0,19	36	Orn	traces
16	Pept.	3,30 ± 0,17	37	Lys	2,41 ± 0,38
17	Pept.	1,35 ± 0,18	38	ε-MeLys	0,62 ± 0,13
18	Glu	0,81 ± 0,10	39	His	2,05 ± 0,34
19	Pro	3,45 ± 0,48	40	*	3,82 ± 0,28
20	Gly	0,38 ± 0,05	41	*	3,11 ± 0,29
21	GSH	traces	42	Arg	2,75 ± 0,43

* : composé non identifié réagissant à la ninhydrine

** : intervalles de confiance à 95%

- Pic no. 3, urée :

  Ce composé, toujours présent, réagit faiblement à la ninhydrine et donne un pic très petit. Comme il est difficile d'en évaluer la surface, nous le mentionnons sous forme de "traces".

- Pics no. 4 - 5 - 6 - 7 :

  Ces pics disparaissent complètement après une hydrolyse partielle de l'extrait, ce qui nous donne de bonnes raisons de croire qu'ils sont assimilables à de petits peptides extractibles à l'éthanol. Après cette hydrolyse partielle, on remarque de fortes augmentations de l'ammoniaque, de la méthionine sulfoxyde et de l'acide aspartique (plus de 500% chaque), de l'acide glutamique (+ 240%), de la glycine (+ 85%) ainsi que de la plupart des autres acides aminés de l'extrait (environ + 10%).

- Pic no. 8, méthionine sulfoxyde :

  Cet AA est le résultat d'une oxydation intermédiaire de la méthionine en méthionine sulfone. Comme ce processus dépend essentiellement de l'élévation de température que subit l'extrait avant (et pendant) l'analyse, la concentration de la méthionine sulfoxyde peut être sujette à beaucoup de variations en sens opposé à celle de la méthionine sulfone. Quelquefois le sommet du pic présente une amorce de séparation, indiquant éventuellement la présence de deux variétés de configuration différente.

- Pic no. 9, méthionine sulfone :

  Ce composé représente le produit final de l'oxydation de la méthionine et il peut subir les mêmes variations que la

méthionine sulfoxyde décrite ci-dessus. Ce pic sort peu avant l'acide aspartique. En cas de mauvaise séparation, on peut faire avancer légèrement la méthionine sulfone en augmentant de 1 à 2 °C la température du bain-marie de circulation de la colonne.

- Pic no. 10, acide aspartique :

  La teneur de cet AA largement répandu est faible par rapport aux valeurs citées dans d'autres plantules. Notons cependant que la concentration en acide aspartique peut être augmentée artificiellement suite à des oxydations de l'asparagine qui est toujours présente en très grande concentration.

- Pic no. 11, thréonine; pic no. 12, asparagine; pic no. 13, sérine :

  Ces trois pics sortent à des distances assez rapprochées, mais en agissant sur la température du bain-marie de circulation, on peut faire avancer ou reculer l'asparagine et assurer ainsi une bonne séparation. Cette forte teneur en asparagine domine toutes les autres puisqu'elle ne représente pas moins du 1/4 de tout l'azote α-aminé.

  En 1868, SACHS décrivait déjà pour des légumineuses l'apparition d'asparagine lors de la germination, alors qu'avant celle-ci, l'amide n'était pas décelable. Plus proche de nous, CHRISTIANSEN et THIMAN (1950) ainsi que LAWRENCE et GRANT (1963) décrivent des quantités très importantes d'asparagine dans les germes de Pois. ARONOFF (1962) trouve des concentrations croissantes en fonction du temps dans les germes de Lupinus, alors que PERDRIZET et coll. (1965) indiquent des quantités importantes pour des mutants de Blé. A la fin de ce travail (Chap III.C.), nous mesurons

encore des quantités importantes pour les jeunes racines de Mais.

Pour plus de précision, nous mesurons le pic d'asparagine à 440 nm, car l'absorption à 570 nm est proche de la hauteur maximale du papier d'enregistrement logarithmique où les erreurs d'estimation sont plus importantes.

- Pic no. 14, glutamine :

C'est par l'analyse aux solutions de tampon lithium que nous avons détecté la glutamine, présente en assez faibles concentrations. Aux solutions de tampon sodium, cet amide sort pratiquement sous la sérine dont il se sépare à peine. Comme de plus la glutamine se dégrade très vite au cours de l'analyse en acide glutamique et surtout en une série de substances diffuses tel que l'acide pyrollidone carboxylique (ORESKES et KUPFER 1967), nous n'avons pu l'enregistrer que sous forme de "traces" dans le tableau XIII.

- Pic no. 15 - 16 - 17 :

Ces pics inconnus sont probablement des peptides de longueur petite à moyenne, car ils diminuent après une hydrolyse partielle à HCl 6N, sans disparaître complètement. Ils ne sont pas identiques aux substances surchargées suivantes qui - décrites dans les plantes - apparaissent dans cette zone du chromatogramme : méthylsérine, sarcosine, acide pipécolique, lanthionide, ou homosérine qui représente environ 30% des AA libres des racines de Pois âgées de 3 jours (LAWRENCE et GRANT 1963).

- Pic no. 18, acide glutamique et no. 19, proline :

Ces deux AA sont facilement reconnaissables à cause de leur

forte absorption à 440 nm. A la suite de l'absence de l'hydroxyproline, la proline est le seul AA dont l'absorption à 440 nm est supérieure à celle de 570 nm. Les variations assez fortes des teneurs en proline pour notre matériel de référence sont dues d'une part à la faible hauteur du pic, d'autre part à ses grandes fluctuations de concentration, comme nous le verrons au chapitre III.

D'après BARNETT et NAYLOR (1966), THOMPSON et coll. (1966) ainsi que SINGH et coll. (1973), la concentration élevée en proline libre est un indicateur du degré de déshydratation pour divers matériels examinés tels que les jeunes pousses d'Herbes, les feuilles de Navet et les racines d'Orge. PALFI et coll. (1973) restreignent cependant ces observations aux tissus pourvus de chlorophylle.

BARNARD et OAKS (1970) constatent un rapport entre la teneur en proline libre et la vitesse de croissance.

- Pic no. 20, glycine; no. 21, glutathion réduit; no. 22, alanine; no. 23, valine :

La glycine, l'alanine et la valine sont des AA très répandus qui apparaissent à des concentrations assez élevées dans notre matériel de référence; le glutathion apparait en tant qu'épaule de la glycine. Comme la concentration de ce tripeptide est assez faible et sujet à des variations durant les manipulations, nous le mentionnons en tant que "traces".

- Pic no. 24, ½cystine; no. 25, méthionine :

La cystine incluse dans les protéines assure les liaisons S-S, importantes pour la structure primaire (YON 1969).

Une fois libérée, cette molécule se clive facilement en deux demi-molécules que nous séparons par chromatographie sous le nom de cystéine ou 1/2cystine. De plus, la molécule peut s'oxyder partiellement en acide cystéique ou en un des dérivés de cet acide qui pourraient correspondre aux pics inconnus no. 1 et no. 2. La méthionine est également fort sujette à l'oxydation après quoi elle se retrouve sous forme de méthionine sulfoxyde et de méthionine sulfone dont nous avons étudié les comportements auparavant.

Pour prévenir ces transformations au cours de l'analyse, nous avons ajouté aux solutions tampons quelques ml de thiodiglycol en tant qu'antioxydant. Cette substance était efficace et nous avons obtenu des pics de cystéine et de méthionine plus élevés. Malheureusement elle absorbe rapidement l'ammoniaque et comme les importants "plateaux d'ammoniaque" peuvent fausser le calcul de tous les pics basiques, nous l'avons finalement abandonnée.

- Pic no. 26, isoleucine et no. 27, leucine :

Ces deux pics n'offrent aucun problème de séparation. Très rarement une légère ondulation de la ligne de base entre les deux pics est apparue, révélant la faible présence d'allo-isoleucine.

- Pic no. 28, norleucine :

Cet AA constitue l'étalon interne communément utilisé. Il n'interfère pas avec l'échantillon, car il n'a jamais été trouvé dans le règne vivant, il est stable et sa séparation par chromatographie est facile. Cet étalon interne, généralement ajouté au moment de la charge de l'échantillon, permet de corriger pour les variations éventuelles de débit

ou de stabilité des réactifs du système d'analyse.

- Pic no. 29, tyrosine; no. 30, phénylalanine; no. 31, β-alanine; no. 32, acide β-aminobutyrique et no. 33, acide γ-aminobutyrique :

  La tyrosine, la phénylalanine et l'acide γ-aminobutyrique, largement répandus dans le règne végétal, sont présents ici à des concentrations d'importance moyenne. La β-alanine ainsi que l'acide β-aminobutyrique se présentent à des concentrations très faibles mentionnées sous forme de "traces".

- Pic no. 34, éthanolamine et no. 35, ammoniaque :

  Ces substances constituent surtout des produits de décomposition. Ainsi, l'ammoniaque peut provenir de réactions de désamination telles que celle des amides, mais aussi d'une absorption de l'ammoniaque ambiant dans les solutions de tampons acides ou d'inclusions dans le thiodiglycol. De ce fait, on n'attache généralement pas beaucoup d'importance à ces deux substances et la plupart des auteurs ne les citent que rarement parmi leurs résultats d'AA.

- Pic no. 36, ornithine; no. 37, lysine; no. 38, ε-méthyllysine et no. 39, histidine :

  L'ornithine sort sous forme de "traces", la lysine et l'histidine, très répandus dans le règne végétal, ont des concentrations moyennement importantes. La ε-méthyllysine a dû être vérifiée à plusieurs reprises par surcharge. Ce pic sort en effet très près de la α-méthyl histidine et de la l-méthyl histidine sans s'y superposer.

- Pic no. 40 :

Ce pic, bien séparé, qui résiste à des hydrolyses très fortes, reste inconnu. Par des surcharges successives, il s'est avéré non identifiable à l'acide α-guanido propionique, la 3-méthyl histidine, la carnosine, la créatinine, ni à la canavanine, pourtant présente en forte concentration dans les extraits de nombreuses semences de l'espèce Vicia (BELL et TIRIMANNA 1965; TURNER et HARBORNE 1967).

- Pic no. 41 et pic no. 42, arginine :

Le pic no. 41, inconnu, sort juste avant l'arginine dont il pourrait être un dérivé. BELL et TIRIMANNA (1963) et (1965) ont en effet décrit la présence de δ-hydroxy-homoarginine dans les semences de Lathyrus ainsi que celle de la δ-hydroxyarginine dans les semences de 17 espèces différentes de Vicia. Nous avons surchargé ce dernier composé qui sortait juste après l'arginine et qui de ce fait ne correspond pas au pic no. 41. L'arginine se trouve en concentration relativement importante dans les jeunes racines, bien qu'elle soit surtout considérée comme une substance de réserve dans les graines (STEWARD et coll. 1958).

Certains acides aminés absents :

Outre les acides aminés absents déjà cités à la suite des surcharges, nous remarquons encore l'absence de quelques composés relativement connus :

- L'hydroxyproline :

STEWARD et coll. (1958) ainsi que CHRISPEELS (1969)

affirment que cet AA apparaît rarement à l'état libre dans les plantes et qu'il n'y a jamais été détecté en quantités importantes. Pourtant le composé est retrouvé - après hydrolyse - dans la fraction soluble à l'acide trichloracétique (JENNINGS et WATT 1967; CHRISPEELS 1969; LAMPORT 1970). Ces auteurs concluent que l'hydroxyproline apparaît sous forme de macromolécule qui se retrouve dans la fraction soluble ou non soluble selon l'importance du poids moléculaire. Ces macromolécules sont des peptides ou des glycopeptides, tels que des hydroxyproline-arabinosides (PILET 1971; LAMPORT et MILLER 1971). Ils semblent être moins solubles à l'éthanol qu'à l'acide trichloracétique (JENNINGS et WATT 1967) et nous ne détectons pas l'hydroxyproline dans l'extrait, même hydrolysé.

Notons qu'à l'état protéinique, LAMPORT (1965 et 1970) et CLELAND (1968) trouvent des quantités appréciables d'hydroxyproline dans les parois. Récemment, JOTTERRAND-DOLIVO et PILET (1974) ont mis en évidence l'hydroxyproline dans les hydrolysats de parois et dans une moindre mesure dans ceux des fractions cytoplasmiques de jeunes racines de Maïs.

L'absence totale d'hydroxyproline dans nos chromatogrammes de l'extrait de racines de Lentille (alors que le pic serait facilement détectable à cause de son absorption préférentielle à 440 nm) peut encore s'expliquer par le fait que :

1) la réaction à la ninhydrine est relativement insensible à l'hydroxyproline

2) l'hydroxyproline peut, même après hydrolyse, subsister

sous forme de plusieurs isomères (CLARKE et ELLINGER 1967) qui apparaissent séparément dans le chromatogramme (LAMPORT et MILLER 1971). Il en résulte un fractionnement du composé dont les différents pics ne sont probablement plus détectables.

- La citrulline :

Cet AA est un maillon indispensable pour la synthèse de l'arginine dans le cycle de KREBS et HENSELEIT (1932), étendu aux végétaux supérieurs par KASTINGS et DELWICHE (1958). C'est pourquoi la citrulline devrait être universellement présente d'après FOWDEN (1973), mais VIRTANEN et MIETTINEN (1953) l'avaient surtout considérée comme une substance de réserve, peu répandue dans les organes de croissance active.

- Le tryptophane :

Des concentrations faibles de tryptophane dans les racines de Mais ont été décrites par SYTNIK et VYNNYCHENKO (1973), alors que INGVERSEN et IVANKO (1971) ainsi que nous même (dans le chapitre à venir III.C.) n'en détectons pas dans le même matériel. CHRISTIANSEN et THIMANN (1950) trouvent du tryptophane libre dans les tiges de Pois adulte; LAWRENCE et GRANT (1963) par contre n'en signalent pas dans l'axe tige-racine de plantules du même matériel. Lors d'une étude des composés indoliques en relation avec la germination de racines d'Hordeum vulgare, SCHNEIDER et WIGHTMAN (1974) trouvent une valeur maximale de tryptophane après 4 jours, correspondant à environ 0,3 µM/100mg de poids sec.

Sur du matériel similaire au nôtre, plusieurs auteurs ont travaillé en rapport avec le tryptophane :

1) PILET et KOBR (1958) citent une stimulation de la croissance par des doses faibles de tryptophane administré, les doses fortes causent une inhibition;

2) KUTACEK et coll. (1971) incubent des racines âgées de 5 jours avec du tryptophane radioactif. Ce dernier est métabolisé en une série d'autres composés indoliques, ou non identifiés, mais à notre connaissance, l'auteur n'a pas trouvé de tryptophane libre dans les racines non traitées;

3) Lors d'une étude systématique des composés indoliques des racines de Lentille, COLLET et coll. (1964) mettent en évidence parmi d'autres "un composé probablement identique au tryptophane".

A la lumière de ces travaux d'une part, et devant l'absence de pic de tryptophane d'autre part, nous pouvons dire que si cet AA est présent dans nos extraits, sa concentration ne devrait pas dépasser 5 nanomoles/100 mg PS, ce qui est environ la limite de détection de notre technique.

4.3. Chromatogramme-type des acides aminés protéiniques

L'analyse du culot hydrolysé donne un chromatogramme de 18 pics d'AA constitutifs des protéines plus la norleucine ajoutée en tant qu'étalon interne (Fig 17). Malgré quelques réserves qui découlent de notre introduction au paragraphe chapitre I.B.2., nous appellerons par la suite les AA de cette fraction, AA "protéiniques", tout comme STEWARD et BIDWELL (1962) ainsi que SODEK et WILSON (1973) l'ont fait pour un matériel semblable. Les concentrations en µM d'AA/

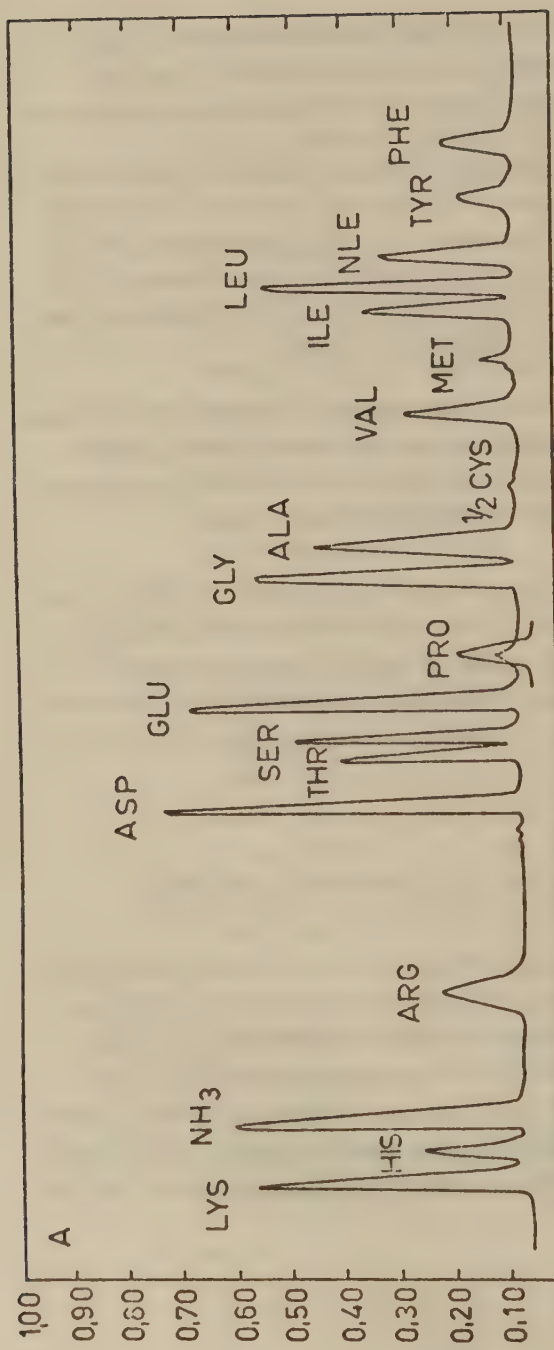


FIGURE 17

Chromatogramme-type des acides aminés protéiniques de racines de Lentille (18 mm).

Charge :

20 µl, ce qui correspond à 0,2 mg de matériel sec;

Etalon interne :

10 µl de norleucine (2,5 µM/ml).

100 mg de PS sont reportées dans le tableau XIV.

Sur le chromatogramme de la figure 17, nous voyons deux ébauches de pics avant celui de l'acide aspartique. Ils correspondent à l'acide cystéique et aux méthionine sulfoxydes qui se sont formés par oxydation de la cystéine et de la méthionine durant l'hydrolyse. Le pic résiduel de la cystéine est pratiquement incalculable dans le chromatogramme et nous le mentionnons sous forme de "traces" dans le tableau XIV.

Notons encore l'absence du pic d'hydroxyproline qui apparait cependant chez les racines de 36 mm de long. Nous avons parlé plus haut (Chap II.2.1.) de la correction (+ 18,5%) de la valeur de la sérine à la suite des importantes pertes durant l'hydrolyse. Le pic de l'ammoniaque représente la somme de la teneur initiale en ammoniaque libre des racines, plus les quantités dégagées par la désamination des amides, la dégradation partielle de la sérine et et de quelques autres AA. Le pic comporte également une partie de l'ammoniaque absorbé dans les tampons et dans la cartouche de chargement. Sa valeur est par conséquent assez aléatoire.

TABLEAU XIV

Teneurs en acides aminés protéiniques du culot hydrolysé de racines de Lentille (18 mm)

Composé	µM / 100 mg PS	Composé	µM / 100 mg PS
Asp	6,08 ± 0,98 *	Met	traces
Ser	5,37 ± 0,31	Ile	3,37 ± 0,16
Thr	3,87 ± 0,51	Leu	5,22 ± 0,26
Glu	6,10 ± 0,45	Nle	étalon int.
Pro	3,23 ± 0,57	Tyr	1,67 ± 0,14
Gly	5,55 ± 0,53	Phe	2,49 ± 0,14
Ala	5,12 ± 0,28	Lys	5,19 ± 0,65
Val	4,64 ± 0,47	His	1,59 ± 0,22
½Cys	traces	NH_3	6,93 ± 1,43
		Arg	3,18 ± 0,64

* : intervalles de confiance à 95%

5. ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE ET SIGNIFICATION DES RESULTATS

5.1. Extraits

5.1.1. Reproductibilité du chromatogramme-étalon à 37 AA

Les analyses de la reproductibilité de l'étalon résultent de dix chromatogrammes différents. Nous en avons établi les équivalents-norleucine pour calculer les déviations standards et les coefficients de variation ($CV_{étal}$) qui figurent dans le tableau XV. Exprimés en pourcents, ils permettent une comparaison des valeurs. Les pics les plus reproductibles sont ceux, bien séparés, du milieu du chromatogramme. Les composés instables ou les pics petits tels que l'éthanolamine ou la proline sont caractérisés par des $CV_{étal}$ plus importants. Vers la fin du chromatogramme les variations augmentent également à cause d'un certain étalement des pics.

5.1.2. Reproductibilité des acides aminés libres de racines de Lentille (18 mm)

Nous avons établi les équivalents-norleucine des pics de six cultures différentes de racines de Lentille (18 mm), extraites et analysées à des périodes différentes pour en calculer la reproductibilité par rapport à des séries d'analyse différentes. Les coefficients de variation ($CV_{échant}$) ainsi trouvés sont également portés dans le tableau XV où l'on voit par comparaison qu'ils sont plus élevés que ceux de l'étalon. Ils contiennent en effet la somme de toutes les variations possibles : les variations propres du matériel (CV_{mat}), les variations

TABLEAU XV

Reproductibilité de l'analyse chromatographique des acides aminés de l'étalon et de ceux, extraits des racines de Lentille (18 mm). Estimation de la variation des acides aminés propre au matériel.

Composé	$CV_{étal}$ (%)	CV_{mat} (%)	$CV_{échant}$ (%)	Composé	$CV_{étal}$ (%)	CV_{mat} (%)	$CV_{échant}$ (%)
MetSO	10,5	8,9	13,9	Ile	6,5	7,0	9,8
$MetSO_2$	11,4	9,2	14,8	Leu	6,0	8,0	9,8
Asp	4,7	5,7	7,7	Tyr	6,3	11,4	13,0
Thr	5,3	8,6	10,3	Phe	7,6	3,7	8,7
Asn	4,3	11,9	12,8	γ-Abu	8,2	1,9	8,7
Ser	6,7	10,2	12,4	$EtNH_2$	13,5	5,4	14,7
Glu	6,6	9,3	11,6	NH_3	9,0	6,7	11,4
Pro	10,7	23,9	26,3	Lys	8,8	12,1	15,1
Gly	5,5	4,4	7,3	ε-MeLys	8,5	17,3	19,4
Ala	6,0	4,3	7,7	His	8,1	13,0	15,5
Val	6,1	2,1	6,8	Arg	7,1	12,9	14,9

$CV_{étal}$: Coefficient de variation de l'analyse chromatographique de l'étalon

CV_{mat} : Coefficient de variation propre au matériel, où :

: $CV_{mat} = \sqrt{CV^2_{échant} - CV^2_{étal} - CV^2_{extraction}}$

$CV_{échant}$: Coefficient de variation de l'analyse chromatographique de l'échantillon

durant l'extraction et les manipulations subséquentes (CV_{extr}) et celles de l'analyse chromatographique données par les coefficients de variation de l'étalon ($CV_{étal}$). Ce dernier comprend les variations dues à l'appareil, au pipettage de l'échantillon et à l'estimation de la surface des pics.

Le $CV_{échant}$, établi pour chaque AA, correspond donc à la somme suivante (GOLDSTEIN 1967) :

$$CV_{échant} = \sqrt{CV^2_{mat} + CV^2_{extr} + CV^2_{étal}}$$

De cette équation il est possible de tirer le CV_{mat}, paramètre intéressant qui représente la variation théorique de la teneur de chaque AA dans la racine au moment de la récolte. Le $CV_{échant}$ et les variations dues à l'analyse sont en effet connus :

- $CV_{échant}$ propre à chaque AA, figure dans le tableau XV;
- CV_{extr} = 2,17, ce coefficient a été calculé au chapitre II.1.3.. Il est commun à tous les AA en supposant un comportement identique à la norleucine lors de l'extraction et des transvasements;
- $CV_{étal}$ propre à chaque AA de l'étalon de 37 AA et des surcharges, figure également dans le tableau XV.

De ce qui précède, on peut calculer le CV_{mat} d'après la formule suivante:

$$CV_{mat} = \sqrt{CV^2_{échant} - CV^2_{étal} - 4,71}$$

Les CV_{mat} pour chaque AA sont portés dans la deuxième colonne du tableau XV. On remarque que ces valeurs sont très étalées, depuis environ

2% jusqu'à 24%. Nous pouvons expliquer certaines de ces valeurs en les comparant aux teneurs absolues des racines de 12, 18 et 26 mm de longueur, mesurées au chapitre III.A.1.2.2. (Fig 19). Les concentrations de proline, arginine, asparagine et histidine subissent de très fortes variations au cours de ces trois stades voisins de croissance, ce qui se répercute probablement aussi au moment de la récolte à 18mm où nous mesurons des CV_{mat} importants. Parallèlement, les teneurs relativement constantes de la valine, de la glycine, de la sérine, de l'acide aspartique et de l'isoleucine à 12,18 et 26 mm semblent témoigner d'un métabolisme plus régulier de ces composés au stade 18 mm, où nous calculons des CV_{mat} plus faibles.

5.2. Hydrolysats

5.2.1. Reproductibilité du chromatogramme-étalon à 18 acides aminés

Les analyses de reproductibilité de l'étalon ont été effectuées sur une série de 15 chromatogrammes dont nous avons établi les équivalents-norleucine. Les $CV_{étal}$ calculés figurent dans la première colonne du tableau XVI. Comme nos surfaces de pic ont été calculées de façon manuelle, il est intéressant d'opposer nos CV à ceux de VON ARX et coll. (1974) qui ont travaillé dans des conditions d'analyse identiques aux nôtres, mais qui disposaient en plus d'un intégrateur automatique de pics. Les résultats de VON ARKX (CV_{lit}) sont portés dans la deuxième colonne du tableau XVI qui montre que chez ces auteurs presque toutes les variations sont plus petites. En faisant la moyenne de tous les CV_{lit} on arrive à 2,12 %; la moyenne des $CV_{étal}$ est de 3,26 % (sans le CV de l'NH_3, pas repris chez VON ARX), ce qui fait une différence absolue de 1,14 % que l'on peut attribuer à la plus grande précision de l'intégration automatique des pics.

TABLEAU XVI

Reproductibilité de l'analyse des acides aminés protéiniques de l'étalon et du culot hydrolysé des racines de Lentille (18 mm); comparaison de nos variations avec celles d'un étalon de la littérature.

Composé	$CV_{étal}$ (%)	CV_{lit} (%)	$\Delta CV_{étal}$ (%)	$CV_{échant}$ (%)
Asp	2,82	1,06	+ 1,76	9,14
Ser	3,67	1,31	+ 2,36	4,61
Thr	3,35	1,17	+ 2,18	8,77
Glu	2,89	1,33	+ 1,56	5,98
Pro	3,14	2,15	+ 0,99	14,09
Gly	2,39	1,58	+ 0,81	6,58
Ala	3,51	1,43	+ 2,08	3,47
Val	3,00	1,25	+ 1,75	4,71
V2Cys	2,41	2,21	+ 0,20	—
Met	5,52	4,98	+ 0,54	--
Ile	2,39	2,63	- 0,24	3,87
Leu	2,69	3,57	- 0,88	4,03
Tyr	2,24	1,37	+ 0,87	6,20
Phe	1,60	2,49	- 0,89	4,56
Lys	4,92	2,94	+ 1,98	7,83
His	3,89	2,94	+ 2,08	8,93
NH_3	8,64	—	—	16,60
Arg	5,04	2,82	+ 2,22	7,27

TABLEAU XVI (suite)

$CV_{étal}$: Coefficient de variation des chromatogrammes de l'étalon (18 acides aminés).

CV_{lit} : Coefficient de variation des chromatogrammes de l'étalon selon la littérature (VON ARX et coll. 1974), dans les mêmes conditions de travail, avec en plus, un intégrateur automatique des pics.

$\triangle CV_{étal} := CV_{étal} - CV_{lit}$

$CV_{échant}$: Coefficient de variation des chromatogrammes de l'échantillon d'acides aminés protéiniques.

Une comparaison entre les tableaux XV et XVI révèle que pour les mêmes AA les variations sont nettement plus petites pour les hydrolysats que pour les extraits. Ceci nous semble essentiellement dû aux facteurs suivants :

1) l'appareillage TSM, plus nouveau, assure des débits plus réguliers et les séparations sont meilleures à cause des colonnes plus étroites (HAMILTON 1965);

2) il y a moins de substances à séparer dans l'hydrolysat. Pour les nombreux pics de l'extrait, le risque de chevauchements partiels et de variations de surface plus ou moins importantes, sont plus grandes que pour l'hydrolysat;

3) l'échantillon hydrolysé est moins complexe. L'extrait contient en effet des amides et de nombreux peptides qui peuvent se transformer partiellement en d'autres AA au cours de l'analyse.

5.2.2. Reproductibilité des acides aminés protéiniques de racines de Lentille (18 mm)

Nous avons calculé la reproductibilité des AA protéiniques à partir de six culots insolubles à l'éthanol, hydrolysés séparément. Les $CV_{échant}$ calculés qui figurent également dans le tableau XVI, sont en général inférieurs à 10 %. Comme les AA du culot proviennent essentiellement des protéines, il semble que dans la racine, ces derniers varient moins que les AA libres. Seuls l'ammoniaque, produit par dégradation au cours de l'hydrolyse, et l'acide aspartique ont des CV plus importants dans l'hydrolysat.

6. COMPARAISON AVEC D'AUTRES METHODES D'EXTRACTION

6.1. Introduction

Déjà avant les années 1920, une série d'auteurs étaient à la recherche d'un précipitant idéal des protéines du sang humain, l'azote du surnageant représentant l'azote aminé libre. HILLER et VAN SLIJKE (1922) ont résumé les travaux précédents en testant pas moins de sept précipitants dont plusieurs à des concentrations différentes. Plus récemment, HANCOCK (1958), sur des microorganismes, et SAIFER (1971), sur des tissus de cerveau, ont fait des comparaisons détaillées du pouvoir d'extraction de différents solvants pour les AA libres.

Sur du matériel végétal, BELL (1963), BOULTER (1966), NGUYEN et PAQUIN (1971), BHATTY et coll. (1973) ainsi que BHATTY et FINLAYSON (1973) ont établi des comparaisons pour les solvants suivants de l'azote non protéique ou des AA libres : eau; bromure d'ammonium cétryltriméthylique; acide perchlorique 0,2 N; n-butanol à 10 %; N,N-diméthylformamide; acide chlorhydrique 0,1 N; hydroxide de sodium 0,1 N; acide tungstique; hydroxyde de cuivre 0,2 N; oxyde ferrique à 5 %; acétate de plomb à 20 %; acide trichloracétique à 1 - 5 - 10 et 20 %; acide phosphotungstique à 5 - 10 et 20 %; coagulation par la chaleur; acide métaphosphorique à 25 %; acide tannique à 0,04 %; acide sulfosalycilique à 5 %; éthanol à 25 - 50 - 70 et 80 %; chlorure mercurique à 5 % dans HCl à 5 %; mélange de chloroforme et d'alcool octylique 8:1 (v/v); mélange de phénol, acide acétique et d'eau 1:1:1 (v/v/v); solution de tampon phosphate à pH=7.

Il est assez surprenant de lire que ces solvants aux propriétés fort différentes extraient tous des quantités appréciables

d'azote non protéinique ou d'AA libres. Comme les rendements sont cependant assez divergents selon le matériel analysé, nous avons refait des comparaisons pour les quatre solvants utilisés le plus souvent dans la littérature récente du matériel végétal : la solution de tampon phosphate à pH=7, le mélange de phénol, acide acétique et d'eau 1:1:1 (v/v/v), l'acide trichloracétique à 5 % et l'éthanol à 70 %. Tous les essais ont été effectués en double sur des aliquotes d'un même lot de racines de Lentille. Dans les extraits nous avons déterminé les concentrations de l'azote par la méthode automatisée de Kjeldahl, ainsi que les teneurs en AA libres. Sur les culots nous avons également déterminé l'azote selon Kjeldahl en vue d'un bilan d'azote total.

6.2. Extraction à une solution de tampon phosphate

BOULTER (1966) et DIXON (1971) ont utilisé une solution de tampon phosphate au pH neutre pour extraire les AA libres de matériel végétal. Dans un tableau comparatif, le premier auteur trouve que ce solvant extrait en général des quantités plus grandes d'AA que l'éthanol à 70 %.

Comme ces auteurs, nous avons préparé une solution 0,02 M d'un mélange de KH_2PO_4 et de Na_2HPO_4 constitué de façon à obtenir un pH=7. L'extraction a lieu selon le même procédé que celui décrit pour l'éthanol au chapitre I.B.1.2.. Après l'extraction par contre, l'échantillon se trouve déjà en milieu aqueux tamponné; il est donc inutile de chasser le solvant sur le rotavapor et de redissoudre l'échantillon dans une solution de tampon acide. En vue de l'analyse chromatographique, il suffit en effet de rendre l'extrait acide, par une faible quantité de HCl cc. et d'ajouter 10 % d'isopropanol en tant qu'agent de conservation. Tout cela nous procure cependant un volume final assez important, de sorte que nous devons charger environ 700 µl

d'échantillon (ce qui est à la limite des possibilités de cette colonne), pour retrouver les pics dans les grandeurs habituelles.

6.3. Extraction à l'acide trichloracétique

L'acide trichloracétique (TCA) est le réactif le plus utilisé pour précipiter les protéines par dénaturation. De nombreux auteurs utilisent alors le surnageant pour en déterminer la matière azotée soluble au TCA. C'est à partir de concentrations de TCA d'environ 13 % et plus (BECKER et coll. 1940; BHATTY et FINLAYSON (1973) que le plus de protéines sont précipitées. Mais à ces concentrations élevées de TCA, il devient difficile à l'évaporer en vue de la concentration de l'échantillon; de plus, il y a un danger accru d'hydrolyse de protéines au cours de l'extraction. Ainsi, la plupart des auteurs travaillent à des concentrations plus faibles (entre 1 et 10 %) où cependant une partie des protéines et des peptides restent en solution et où l'on extrait moins d'AA basiques qu'à l'éthanol (BHATTY et FINLAYSON 1973).

Pour nos essais, nous nous sommes inspirés de la technique de PILET et SIEGENTHALER (1959) et de celle de NGUYEN (1971). Seulement, nous avons utilisé une solution de TCA à une concentration finale de 5 % au lieu de 2,5 %, ce qui constitue un compromis face aux arguments invoqués ci-dessus.

La première extraction s'effectue dans un tube MSE couvert, pendant une nuit (15 h) à la température de l'eau courante (environ 11 ^{o}C), l'agitation étant assurée par un bras mécanique. Le lendemain, l'extraction est répétée pendant 3 h avec du nouveau solvant, dans les mêmes conditions. Les solutions réunies sont ensuite centrifugées (2 ^{o}C, 18.000 g), le surnageant est évaporé à sec et redissous dans

l'acide chlorhydrique 0,01 N tandis que le culot est lyophilisé et ensuite conservé bouché, congelé (-30 °C) en attendant l'hydrolyse.

6.4. Extraction au mélange phénol/acide acétique/eau

Ce solvant d'extraction a été proposé la première fois par SYNGE (1964); il a été appliqué ensuite au matériel végétal par ses collaborateurs BAGDASARIAN et coll. (1964 ainsi que par JENNINGS et WATT (1967) qui ont montré qu'à des proportions 2:1:1 (p/v/v), le mélange phénol/acide acétique/eau (P/A/E) extrait jusqu'à 95 % de l'N total du matériel végétal. Dans cet extrait global, les protéines peuvent ensuite être précipitées par une solution d'acide trichloracétique ou d'acétone (NGUYEN 1971) ce qui laisse en solution les AA libres.

C'est sur le mode d'extraction décrit dans ce dernier travail que nous nous sommes basés pour nos essais : les racines lyophilisées sont broyées dans un mélange P/A/E 1:1:1 (v/v/v), selon la technique déjà décrite au chapitre I.B.1.2.. L'extraction se fait en deux fois comme pour celle à l'acide trichloracétique, décrite ci-dessus. Les culots sont séparés par centrifugation et aux surnageants réunis on ajoute une fois le volume d'acide trichloracétique à 10 %. Après avoir reposé toute la nuit au frigo, le précipité est centrifugé et lyophilisé. Il se présente alors comme une fine pellicule de protéines recouvrant le fond du tube MSE que l'on conserve au congélateur. Le surnageant contenant les AA libres est concentré au rotavapor (< 35 °C). Bien qu'au cours de cette opération nous ayons fréquemment ajouté de l'eau à l'extrait pour constituer un mélange azéotrope plus volatil de 90 % d'eau et de 10 % de phénol, il n'a pas été possible de conduire l'évaporation jusqu'à sec, comme le décrivent

CLARKE et ELLINGER (1967) et nous l'avons arrêtée avec un résidu non volatil de 1 à 2 ml. En vue de l'analyse, ce résidu a été porté au volume final désiré, à l'aide de la solution tampon à pH=2,87 qui est la première solution d'élution chromatographique.

6.5. Résultats et discussion

Nous avons d'abord déterminé les teneurs en azote total extrait et résiduel en fonction des différents solvants (Tab XVII). Les valeurs de l'extrait à l'éthanol nous servent de référence par rapport à laquelle nous avons pu calculer les variations dues au solvant uniquement.

- La solution de tampon phosphate extrait plus de 38 % d'azote libre que l'éthanol, ce qui confirme - dans une moindre mesure - la tendance décrite par BOULTER (1966) sur des graines de Pois (+ 108%). Seulement cet auteur suppose que cette solution tampon favorise l'hydrolyse enzymatique des protéines au cours de l'extraction. Une indication sur la présence de protéines est obtenue après l'acidification, où de petits précipités se forment. Nous n'avons pas pu faire cette observation, probablement parce que notre extraction dure beaucoup moins longtemps et favorise ainsi moins l'extraction et l'action des enzymes. En revanche, notre résidu insoluble contient 39 % d'azote en moins ce qui n'exclut pas une hydrolyse partielle.

  Notons encore que pour des extractions à l'acide métaphosphorique à 25 %, BELL (1963) trouve également des valeurs élevées d'azote soluble dans le son et la farine de Blé.

TABLEAU XVII

Mesure de l'azote (N) soluble et insoluble de jeunes racines de Lentille en fonction de différents solvants d'extraction

Solvant	N soluble mg/100mg PS	Δ_1 %	N insoluble mg/100mg PS	Δ_2 %	N total mg/100mg PS
EtOH	2,59	—	1,76	—	4,36
Phos	3,58	+ 38,2	1,07	- 39,2	4,65
TCA	2,91	+ 12,4	1,44	- 18,2	4,35
PAE	2,58	- 0,4	1,69	- 3,9	4,27

EtOH : éthanol à 70 %

Phos : solution de tampon phosphate 0,02 M, à pH=7

TCA : solution d'acide trichloracétique à 5 %

PAE : solution de phénol, acide acétique et d'eau, 1:1:1 (v/v/v)

$\Delta_1 \% := 100\ (N_{\text{sol à X}} - N_{\text{sol à l'EtOH}}) / N_{\text{sol à l'EtOH}}$

$\Delta_2 \% := 100\ (N_{\text{insol à X}} - N_{\text{insol à l'EtOH}}) / N_{\text{insol à l'EtOH}}$

X correspond soit à Phos, à TCA, soit à PAE

- L'extraction à l'acide trichloracétique (TCA) donne 12,4 % plus d'azote que celle à l'éthanol et 18,4 % moins d'azote dans le culot. Sur différentes farines, BELL (1963) et BHATTY et coll. (1973) comparent l'extraction éthanolique à celle du TCA concentré resp. à 1 - 5 - 10 et 20 %. Dans tous les cas l'éthanol extrait beaucoup moins d'azote que le TCA. Mais dans ce dernier solvant BHATTY caractérise jusqu'à 75 % de protéines. De plus, les rendements sont très différents selon le matériel, ce qui incite BELL à conclure qu' "une méthode satisfaisante pour un groupe (de matériel) peut donner des résultats erronnés pour un autre ...".

- Le mélange phénol/acide acétique/eau (P/A/E) extrait environ la même quantité d'azote que l'éthanol. NGUYEN (1971) confirme ces résultats au niveau des AA libres de Luzerne; BELL (1963) par contre, trouve des quantités plus importantes d'azote soluble au mélange P/A/E dans le son et la farine de Blé.

Dans le tableau XVII, il nous a paru intéressant de faire le bilan de l'azote total par addition de la teneur en azote soluble et insoluble pour chaque solvant ci-dessus. Si au cours des extractions acides ou neutres les dégradations sont possibles, l'azote élémentaire ne peut pas disparaître et toutes les valeurs de l'azote total devraient être identiques dans les limites de la variabilité du matériel et de l'appareil de mesure de l'azote total (1,28%, d'après le tableau VIII). Cependant, les bilans varient de plusieurs %; ainsi le plus élevé est celui pour les racines extraites à la solution de tampon phosphate, suivi de ceux à l'éthanol, au TCA et au mélange P/A/E. On constate que ces résultats sont en rapport avec la complexité de la méthode d'extraction qui peut engendrer des pertes

importantes (voir pour la norleucine au chapitre II.1.2.1.). Ainsi l'extraction à la solution de tampon phosphate qui n'implique pas de concentration de l'échantillon par évaporation à sec, cause moins de pertes par des manipulations que l'extraction à l'éthanol, au TCA, ou que celle au mélange P/A/E qui s'évapore mal et qui implique une précipitation supplémentaire à la solution de TCA.

Pour les valeurs d'AA libres en fonction des différents solvants, nous avons retenu les équivalents-norleucine de l'extrait éthanolique en tant que valeurs de références. Par rapport à ces derniers nous avons calculé les variations dans le tableau XVIII. Les AA y figurent dans l'ordre de l'élution chromatographique, c'est-à-dire d'après les acidités décroissantes.

En examinant les variations dans leur ensemble, on remarque que celles-ci sont soit positives soit négatives par groupes consécutifs d'AA. La possibilité d'extraction semble donc dépendre essentiellement des charges acides ou basiques des composés. L'extrait à la solution de tampon phosphate qui donnait une grande quantité d'azote soluble, se caractérise également par une forte augmentation des concentrations d'AA libres par rapport à l'extrait de référence. Certains AA protéiniques tels que la méthionine (oxydée), l'asparagine, la sérine, l'acide glutamique, la proline, la glycine et l'alanine présentent des concentrations majorées de plus de 25 %. Ceci est un indice supplémentaire pour l'hydrolyse partielle qui affecterait les protéines au cours de cette extraction.

Les variations de certains peptides sont importantes : il y a un agrandissement des pics 4, 16 et 17; alors que les pics 5 et 6 ont pratiquement disparu. Une image similaire se présente pour les autres solvants d'extraction, excepté pour le pic 4. Il

TABLEAU XVIII

Variations de la teneur en acides aminés libres de racines de Lentille en fonction de différents solvants d'extraction

Composé	Extr. EtOH (éq.Nle)	Δ Phos (%)	Δ TCA (%)	Δ PAE (%)
Pic 1	0,03	$\leqslant 0$	$\leqslant 0$	$\leqslant 0$
Pic 2	0,23	$\pm$ 0,0	+ 65,3	$\leqslant 0$
Pic 4	0,07	+ 53,7	+ 32,0	- 42,9
Pic 5	0,55	$\leqslant 0$	$\leqslant 0$	$\leqslant 0$
Pic 6	0,25	$\leqslant 0$	$\leqslant 0$	$\leqslant 0$
Met SO	0,24	+ 59,1	+ 23,1	- 47,5
Met SO_2	0,09	$\geqslant 0$	$\geqslant 0$	$\geqslant 0$
Asp+Thr	0,96	+ 9,1	- 17,1	- 31,9
Asn	3,62	+ 26,8	+ 2,8	+ 3,6
Ser	0,44	+ 43,2	+ 4,4	+ 29,5
Pic 16	1,13	+ 5,4	+ 1,0	+ 1,8
Pic 17	0,49	+ 24,5	+ 2,2	+ 4,2
Glu	0,42	+ 30,8	- 9,5	+ 6,8
Pro	0,66	+ 56,2	+ 12,0	+ 7,5
Gly	0,33	+ 28,7	+ 5,2	+ 5,2
Ala	0,42	—	- 26,3	+ 14,2
Val	0,92	+ 11,9	- 16,4	- 10,9
Ile	0,49	+ 16,4	- 8,5	- 6,4
Leu	0,37	+ 16,2	- 8,1	- 8,1
Tyr	0,40	+ 2,8	- 9,9	- 2,5
Phe	0,63	+ 1,6	- 9,5	- 4,6

TABLEAU XVIII (suite)

Composé	Extr. EtOH (éq.Nle)	Δ Phos (%)	Δ TCA (%)	Δ PAE (%)
γ-Abu	0,32	+ 18,7	± 0,0	+ 12,7
$EtNH_2$	0,42	+ 26,2	- 13,5	- 26,1
NH_3	1,56	- 14,7	- 9,0	+ 78,1
Lys	0,68	+ 13,2	- 6,3	- 3,1
ε-MeLys	0,84	- 17,7	- 21,4	- 14,2
His	0,70	- 5,8	± 0,0	+ 7,1
Pic 40	1,02	+ 12,7	± 0,0	+ 1,0
Pic 41	0,97	+ 9,4	+ 3,1	- 10,3
Arg	1,12	+ 0,9	+ 0,9	± 0,0

Δ Phos : = 100 (AA_i extrait au tampon phosphate - AA_i extrait à l'éthanol) /AA_i extrait à l'éthanol

TCA : solution trichloracétique à 5 %

PAE : mélange phénol/acide acétique/eau, 1:1:1 (v/v/v)

semble donc que les premiers composés s'extraient mieux qu'à l'éthanol, alors que les seconds subissent une hydrolyse totale, qui cause une augmentation de la plupart des AA libres. Notons encore que seulement trois AA basiques sont extraits en moindre quantité par ce solvant comparé à l'éthanol.

L'extrait à la solution de TCA donne en général une teneur plus élevée des AA acides jusqu'à la glycine, alors qu'après, pour les AA neutres et faiblement basiques la tendance est inverse; pour les derniers AA basiques (histidine, pics inconnus no. 40 et 41, arginine), les variations redeviennent faiblement positives. SAIFER (1971) constate les mêmes tendances, alors que BHATTY et FINLAYSON (1973) observent des valeurs tantôt plus élevées, tantôt plus basses selon le matériel analysé.

Par la méthode au mélange P/A/E, on extrait en général les mêmes quantités d'AA qu'à l'éthanol. NGUYEN (1971) qui compare les deux solvants pour la Luzerne, trouve également des valeurs assez proches pour les deux méthodes. Tout comme cet auteur, nous enregistrons cependant quelques variations importantes : celles de la teneur en acide aspartique et en méthionine (oxydée) qui diminuent d'environ 30 %, celle de l'acide δ-aminobutyrique qui atteint + 100%, contre + 12,8 % seulement pour nos essais. Nous notons encore des variations importantes du pic inconnu no. 3 et du pic d'ammoniaque non repris chez NGUYEN.

6.6. Conclusions

A la suite des mesures comparatives ci-dessus, nous pensons que le meilleur solvant d'extraction d'AA libres n'est pas nécessairement celui qui extrait les quantités les plus importantes d'azote soluble ou d'AA, mais celui qui remplit les conditions suivantes :

1) le solvant doit permettre une extraction complète de tous les AA libres;

2) il doit être le plus spécifique possible;

3) il ne doit pas engendrer des réactions secondaires qui impliquent des AA que l'on désire quantifier;

4) il doit être non corrosif, facile à évaporer et il doit nécessiter un minimum de manipulation.

Nous pensons que les quatre solvants testés obéissent au critère no. 1, bien que SAIFER (1971) ainsi que BHATTY et FINLAYSON (1973) citent une extraction plus faible des AA basiques par l'éthanol. Cette observation ne s'est cependant pas confirmée pour nos essais. Le critère no. 2 nous amène à éliminer la solution de TCA inférieure à 13 %, qui extrait progressivement plus de matériel peptidique et protéinique. La solution de tampon phosphate est supposée extraire également des peptides et des protéines, dont des enzymes protéolytiques. Pour ces derniers, les conditions de milieu sont propices aux réactions d'hydrolyse des protéines insolubles dont les AA libérés s'ajoutent à la fraction soluble d'azote. Nous éliminons donc ce solvant qui ne suffit pas aux exigences no. 2 et 3. En revanche, la solution de TCA concentrée à plus de 13 % ne serait un agent d'hydrolyse qu'à partir d'une concentration de 50 % (BHATTY et FINLAYSON (1973). Notons encore que la solution de TCA tout comme l'éthanol, dénaturent rapidement les protéines, ce qui coupe court à toute hydrolyse enzymatique qui donnerait des AA libres supplémentaires.

Contraire au critère no. 4, le phénol du mélange P/A/E est toxique à la respiration ainsi qu'au contact de la peau. Cette caractéristique le rend également peu propice aux nombreuses manipulations que la méthode exige; de plus, il s'évapore très difficilement. On lui

préfère donc l'éthanol ou la solution TCA. Pourtant cette dernière, moyennement concentrée, présente également des problèmes d'évaporation, de sorte que nous avons choisi l'éthanol à 70% (v/v) en tant que solvant répondant le mieux à nos critères d'extraction d'AA libres.

7. INFLUENCE DE LA CONSERVATION DES RACINES

Nous ne connaissons que relativement peu de travaux qui aient effectué des analyses d'AA en fonction de la durée et du mode de conservation du matériel végétal.

REY (1960) et (1964) décrit les avantages de la lyophilisation pour conserver inaltéré du matériel biologique. Ce procédé permet de conserver actives certaines protéines telles que des antigènes et différentes enzymes (COUDERT 1960) ainsi que l'auxine-oxydase purifiée de jeunes racines de Lentille (LAVANCHY 1970). Les étapes critiques sont celles de la congélation et du dégel qui doivent être rapides. Pourtant, MAIA et LUH (1970) constatent que les enzymes responsables du brunissement de bananes restent actives à l'état lyophilisé.

PERKINS (1961) ainsi que NELSON et SMITH (1972) trouvent une augmentation générale des teneurs en AA libres des racines Alfalfa et des feuilles de Froment conservées respectivement à -20 ^{o}C et à -16 ^{o}C, après lyophilisation. Pour beaucoup d'espèces végétales conservées à des températures de vernalisation, PRECHT et coll. (1973) citent une diminution générale des substances de réserve. Parmi celles-ci, les protéines se dégradent en acides AA et

même jusqu'à l'état de substances inorganiques. Dans une étude spécifique des réactions dans les systèmes congelés, GRANT et ALBURN (1967) décrivent la réaction à -23 °C d'AA tels que de la glutamine, l'asparagine, la sérine, le tryptophane, la phénylalanine et l'acide glutamique avec l'hydroxylamine. Cette réaction en milieu solide serait même facilitée par la structure cristalline de la glace qui aurait un effet catalytique et qui assure de surcroît une plus grande mobilité de l'ion H^+.

Au cours de nos essais, les racines sont en principe excisées, immédiatement lyophilisées et mises au congélateur (-30 °C) dans des tubes fermés. L'extraction et l'hydrolyse suivent en général après quelques jours et une série d'essais est traitée de façon simultanée. Il nous a cependant paru intéressant de comparer des racines de Lentille (35-40 mm) fraîches à d'autres conservées pendant 13 mois au congélateur à -30 °C: deux lots avaient été lyophilisés au préalable, deux autres pas, ce qui permet de déterminer les meilleures conditions de conservation et de voir l'influence de l'eau, même cristallisée, sur le métabolisme azoté à basse température.

Pour tous les essais nous avons mesuré l'azote selon Kjeldahl ainsi que tous les AA. Les résultats d'azote figurent dans le tableau XIX, ceux des AA libres dans le tableau XX et ceux des AA protéiniques dans le tableau XXI. En considérant le matériel frais comme donnant les valeurs de référence, nous avons pu calculer directement les variations en fonction du mode de conservation.

Concernant les valeurs de l'azote, on peut dégager trois remarques à partir du tableau XIX :

1) les bilans d'azote total obtenus par l'addition de l'azote extractible et de l'azote non extractible donnent des valeurs similaires, aux variations près

TABLEAU XIX

Variations de la teneur en azote soluble et insoluble de jeunes racines de Lentille en fonction de différents modes de conservation du matériel

Mode de conservation du matériel	Extrait		Hydrolysat		Total
	mg N/ 100mg PS	Δ%	mg N/ 100mg PS	Δ%	mg N/ 100mg PS
Frais, non conservé	2,62	—	1,82	—	4,44
Lyophilisé et congelé (13 mois,-30°C)	2,70	+ 3,05	1,66	- 8,79	4,36
Non lyophilisé et congelé (13 mois,-30°C)	2,78	+ 6,11	1,73	- 4,95	4,51

N : azote

Δ% = 100 (Matériel conservé - Matériel frais)/Matériel frais.

de la technique (Chap II.3.1.3.). Il n'y a donc ni disparition, ni absorption d'azote au cours de la conservation;

2) la teneur en azote soluble augmente pour le matériel conservé, de 6% pour le matériel non lyophilisé et de 3% pour le matériel lyophilisé;

3) parallèlement les concentrations en azote insoluble sont diminués chez le matériel conservé.

Ces observations laissent supposer un début d'hydrolyse des protéines avec une accumulation subséquente de matériel soluble à l'éthanol. A des températures moins basses les mêmes tendances ont été rapportées par WOLF (1958) pour des tubercules de Pommes de terre conservées pendant 124 jours à 0 ^{o}C.

En consultant les variations des AA libres du tableau XX, on est surpris de ne pas trouver la même tendance montante que pour l'azote soluble, ni celles, citées ci-dessus par PERKINS (1961) ou par NELSON et SMITH (1972). Les concentrations du matériel conservé non lyophilisé diminuent en effet de l'ordre de 20%, le lyophilisé d'environ 15%. Cette diminution est générale pour tous les AA, excepté une faible augmentation de la teneur en acide aspartique.

Les valeurs des AA protéiniques (Tab XXI) varient de façon assez parallèle pour les deux modes de conservation. Si les concentrations de trois AA augmentent de l'ordre de 10%, la plupart des autres diminuent. Tout comme chez les AA libres, le phénomène est accentué pour le matériel non lyophilisé.

L'ensemble des résultats obtenus pour divers matériels et pendant des durées de conservation différentes est apparamment

TABLEAU XX

Variations de la teneur en acides aminés libres de jeunes racines de Lentille en fonction de différents modes de conservation du matériel

Composé	Matériel frais (éq.Nle)	Δ_1 (%)	Δ_2 (%)	Composé	Matériel frais (éq.Nle)	Δ_1 (%)	Δ_2 (%)
Pic 1	0,03	± 0,0	± 0,0	Gly	0,33	- 15,2	- 12,1
Pic 2	0,23	- 32,6	- 15,2	Ala	0,42	- 14,3	- 9,5
Pic 4	0,07	± 0,0	- 14,3	Val	0,92	- 13,6	- 8,2
Pic 5	0,55	- 0,9	- 2,7	Ile	0,49	- 19,4	- 8,2
Pic 6	0,25	- 28,4	- 32,0	Leu	0,37	- 23,0	- 9,5
Met SO	0,24	- 52,8	- 37,5	Tyr	0,40	- 37,5	- 22,5
Met SO_2	0,09	- 48,9	- 45,6	Phe	0,63	- 20,6	- 11,1
Asp	0,56	- 6,3	+ 0,9	γ-Abu	0,32	± 0,0	- 12,5
Thr	0,40	- 22,5	- 10,0	$EtNH_2$	0,42	- 21,4	- 27,4
Asn	3,62	- 9,1	- 4,4	NH_3	1,56	- 34,3	- 44,2
Ser	0,44	- 47,7	- 45,5	Lys	0,68	- 11,8	- 5,9
Gln	0,15	- 53,3	- 40,0	ξ-MeLys	0,84	- 35,7	- 23,8
Pic 16	1,13	- 0,9	- 0,4	His	0,70	- 10,0	- 10,7
Pic 17	0,49	- 20,4	- 8,2	Pic 40	1,02	- 16,7	- 10,3
Glu	0,42	- 25,0	- 10,7	Pic 41	0,97	- 19,1	- 12,4
Pro	0,66	- 44,7	- 12,9	Arg	1,12	- 29,0	- 10,7

Δ_1 = 100 (Matériel non lyophilisé congelé - Matériel frais) /Matériel frais

Δ_2 = 100 (Matériel lyophilisé congelé - Matériel frais) /Matériel frais

TABLEAU XXI

Variations de la teneur en acides aminés protéiniques de jeunes racines de Lentille en fonction de différents modes de conservation du matériel

Composé	Matériel frais (éq.Nle)	Δ_1 (%)	Δ_2 (%)	Composé	Matériel frais (éq.Nle)	Δ_1 (%)	Δ_2 (%)
Asp	0,84	- 3,57	+ 3,57	Ile	0,56	- 5,36	- 3,57
Ser	0,61	- 6,56	- 3,28	Leu	0,80	- 2,50	$\pm$ 0,0
Thr	0,57	- 12,28	- 5,26	Tyr	0,46	+ 8,70	+ 15,22
Glu	0,82	- 1,22	- 1,22	Phe	0,61	- 4,92	+ 1,62
Pro	0,87	- 33,33	- 32,18	Lys	1,19	- 17,65	- 14,29
Gly	0,77	- 7,79	- 2,60	His	0,71	+ 9,86	+ 18,31
Ala	0,69	$\pm$ 0,0	$\pm$ 0,0	NH_3	1,91	- 29,84	- 24,61
Val	0,63	- 11,11	- 1,59	Arg	1,05	+ 10,48	+ 11,43

Δ_1 = 100 (Matériel non lyophilisé congelé - Matériel frais) /Matériel frais

Δ_2 = 100 (Matériel lyophilisé congelé - Matériel frais) /Matériel frais

contradictoire. Ceci nous impose une certaine prudence pour l'interprétation.

Pour KAREL et coll. (1973) qui étudient le comportement du matériel au cours de la lyophilisation, la phase initiale de congélation cause une dénaturation partielle des protéines où les groupements S-S peuvent être impliqués. L'augmentation de la teneur en AA libres après trois mois de conservation mesurée par PERKINS (1961) ainsi que par NELSON et SMITH (1973) suggèrent l'hypothèse d'une hydrolyse des protéines durant cette période. Ces derniers auteurs, qui font une deuxième mesure après 6 mois, notent déjà une diminution de la teneur en AA libres. Nos valeurs, enregistrées après 13 mois de conservation, sont également plus basses que celles du matériel frais. Comme d'autre part, la teneur en azote soluble reste plus élevée, il y a eu accumulation de matériel azoté non aminé, extractible, qui ne réagit plus à la ninhydrine. Il semble donc que l'hydrolyse initiale soit progressivement remplacée par une décomposition des AA libres en petites molécules d'azote inorganique tel que PRECHT et coll. (1973) le citent.

De ces observations, on peut dégager essentiellement trois règles pour la suite de nos essais :

1. le matériel frais est à préférer au matériel conservé;

2. si l'on est obligé de garder du matériel au congélateur, il est préférable de le lyophiliser avant;

3. dans une série d'essais, il n'est pas indiqué de comparer du matériel frais à du matériel conservé.

8. CARACTERISTIQUES SPECTROPHOTOMETRIQUES DE L'EXTRAIT

Une possibilité de mieux caractériser notre extrait éthanolique est d'en enregistrer un spectre d'absorption complet. Nous l'avons effectué à l'aide de l'appareil PYE UNICAM SP 1800, ULTRA VIOLET SPECTROPHOTOMETER qui permet un enregistrement de spectre de 190 à 710 nm. Nous avons analysé une solution composée de plusieurs extraits éthanoliques de jeunes racines de Lentille (18 et 35 mm) ainsi que le solvant pur, l'éthanol à 70%. Celui-ci peut en effet avoir une absorption propre (WETLAUFER 1962).

La partie la plus intéressante du spectre a été représentée à la figure 18 où nous avons caractérisé les pics suivant :

- pour le solvant, un pic pointu vers 200 nm qui diminue très fort jusqu'à 210 nm et ensuite moins jusqu'à 240 nm où la ligne de base est atteinte;

- pour l'extrait, une absorption maximale à 210 nm (pas complètement visible sur la figure 18), une épaule vers 238 nm, et deux pics moins élevés à 270 et 305 nm.

Le pic de l'extrait à 210 nm est caractéristique de liaisons peptidiques (YON 1969). Il confirme ainsi la présence de peptides déjà repérés dans notre chromatogramme-type (Chap II.4.2.). Il faut cependant signaler une contribution de la méthionine et de l'histidine qui absorbent également dans cette région du spectre (WETLAUFER 1962).

Selon ce dernier auteur, le tryptophane et la tyrosine, qui absorbent fortement à 220 et 230 nm, pourraient contribuer à

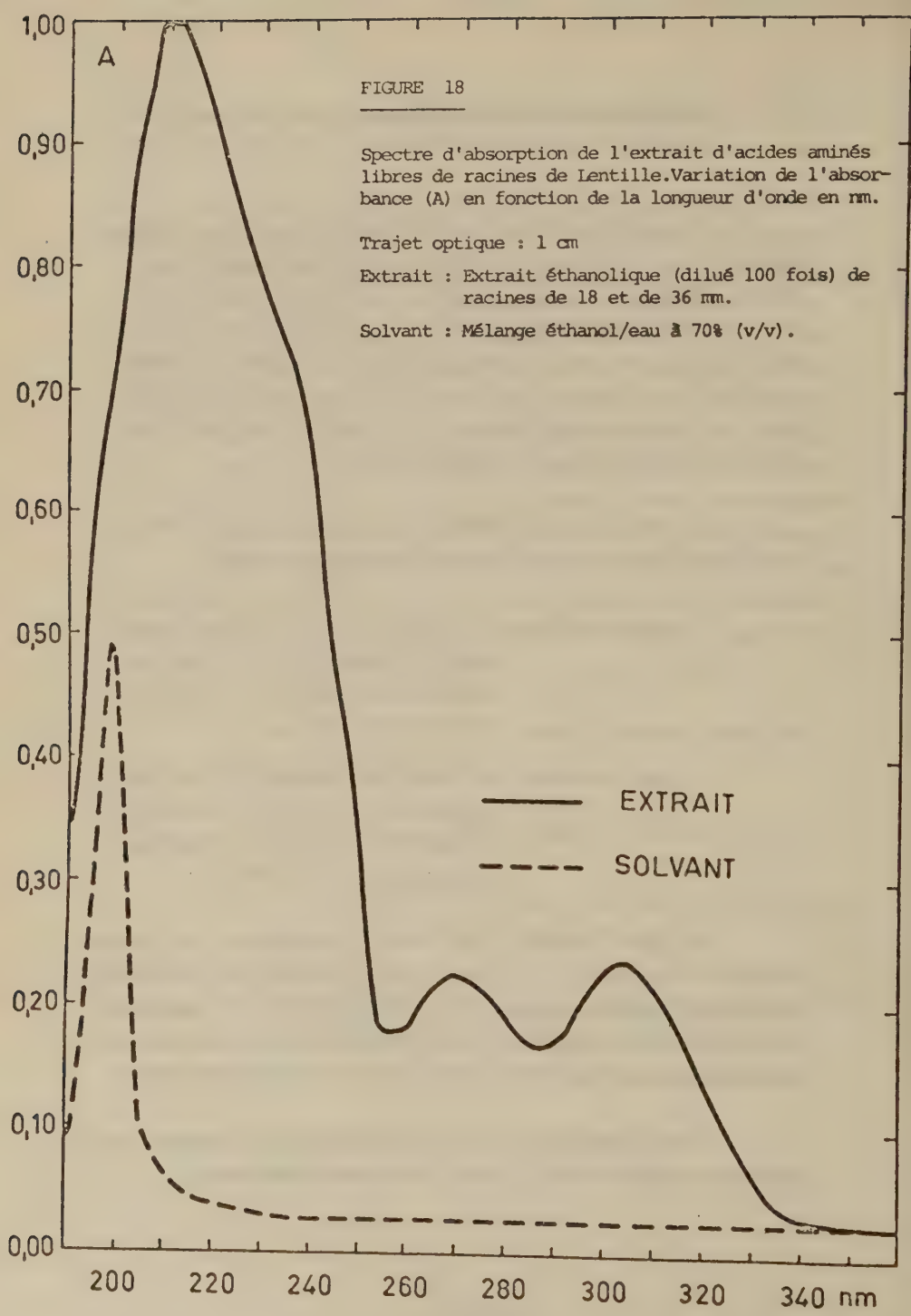


FIGURE 18

Spectre d'absorption de l'extrait d'acides aminés libres de racines de Lentille. Variation de l'absorbance (A) en fonction de la longueur d'onde en nm.

Trajet optique : 1 cm

Extrait : Extrait éthanolique (dilué 100 fois) de racines de 18 et de 36 mm.

Solvant : Mélange éthanol/eau à 70% (v/v).

l'absorbance élevée de 210 à environ 240 nm. Ces deux AA ne peuvent cependant pas engendrer le pic sous forme d'épaule à 238 nm, pour lequel nous n'avons pas d'explication.

Le pic à 270 nm est le résultat des absorptions cumulées de la tyrosine et de la phénylalanine dont les maxima d'absorption se situent respectivement à 260 et 280 nm;autour du pic, les densités optiques à 280 nm restent d'ailleurs assez élevées.

Le pic à 305 nm semble être en dehors de tout maximun d'absorption de matériel aminé ou peptidique largement étudié par WETLAUFER (1962). Seul le tryptophane qui donne des pics élevés à 280 et à 288 nm, possède encore une certaine absorption à cette longueur d'onde (EDELHOCH 1967). Cet AA ne pourrait cependant pas à lui seul former ce pic sans également augmenter les absorptions à 280 et à 288 nm. Nous en concluons que le pic à 305 nm, tout comme l'absorption à 238 nm sont dus à une ou plusieures substances extractibles à l'éthanol, mais différentes des AA ou peptides.

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSION

A. EVOLUTION DU TAUX EN ACIDES AMINES DES RACINES DE LENTILLE

1. VARIATIONS EN FONCTION DE LA LONGUEUR DES RACINES

1.1. Introduction

Comme nous l'avons déjà mentionné dans l'Introduction du chapitre I, la germination de la graine est accompagnée d'importants changements physiologiques et biochimiques.

Déjà l'imbibition de la graine marque le début d'une respiration accrue qui fournira l'énergie nécessaire aux processus de synthèse et d'activation des enzymes en vue de la dégradation du matériel de réserve des cotylédons (KOEHLER et BORRISS 1967). Lors du développement et de la croissance initiale de la plante, les réserves devenues disponibles sont transportées depuis les cotylédons vers l'axe embryonnaire qui peut ainsi s'allonger et augmenter de poids.

Certains auteurs tels que MAC KEE (1958), ZIEGLER (1961), ainsi que STEWARD et DURZAN (1965) ont fait une synthèse des nombreux travaux concernant les variations de l'azote total, soluble ou insoluble au cours des premiers stades de la croissance. Dans ce contexte

nous nous limitons à citer les travaux de DANIELSSON (1951), COTA et coll. (1953), STOKES (1953), VIRTANEN et MIETTINEN (1953), SHIRAKAWA et OTAKARA (1956), LAWRENCE et coll. (1959), IGLE et coll. (1963), SIEGENTHALER (1963), BEEVERS et GUERNSAY (1966), WILKINS (1969); surtout orientés vers les changements des teneurs en azote. Des travaux - généralement plus récents - concernant les variations d'acides aminés (AA) au cours de la germination et de la croissance ont été effectués par GANGULI (1955), ARONOFF (1962), BOULTER et BARBER (1963), LAWRENCE et GRANT (1963), LINSKENS et SCHRAUWEN (1969), SCHUPHAN et SCHWERDTFEGER (1972), ainsi que par JAKHER et coll. (1974). D'autres auteurs ont suivi l'évolution de l'un ou l'autre AA bien défini, telle que celle de la leucine (OAKS, 1965), de l'arginine (GUTTION 1964; JONES et BOULTER 1968; SCHUPHAN et SCHWERDTFEGER 1972; ABDUL-BAKI 1973), de l'acide γ-aminobutyrique (ANDRIES et coll. (1973) ou du tryptophane (SCHNEIDER et WIGHTMAN 1974). D'une manière générale l'évolution de ces AA est similaire à celle de l'azote total. Certaines études rapportent l'effet d'un ou de plusieurs facteurs externes sur le métabolisme des AA au cours de la germination. Ainsi des températures basses inhibent tout le processus de mobilisation des substances de réserve au niveau des cotylédons et aussi la protéosynthèse dans l'embryon. Il en résulte une accumulation dans ce dernier des AA suivants : acides aspartique, glutamique et γ-aminobutyrique alanine, proline et arginine (BELETSKAYA 1971).

L'influence de la durée d'éclairement sur les AA a été étudiée par MAC KEE (1950), NANDI (1958) ainsi que STEWARD et DURZAN (1965). BONNER (1949) trouve un effet stimulateur à la croissance par l'arginine administrée aux cotylédons; ces observations sont confirmées par FRIES (1953) qui attribue les mêmes propriétés à la glycine, alors que l'apport externe d'autres AA est sans effet sur la croissance. IVANKO et INGVERSEN (1971) constatent une incorporation préférentielle de l'azote marqué dans l'arginine et les deux amides asparagine et glutamine de racines de Maïs. Nous n'allons pas étendre ici les citations à d'autres effecteurs, notamment aux phytohormones, dont il sera question dans le chapitre consacré à la morphactine.

Avant d'aborder nos résultats, il est intéressant de faire le point de tous les travaux ci-dessus. Bien que pour ces derniers le matériel, les méthodes d'analyse et les critères de référence soient souvent différents, on peut généralement admettre que les premiers jours de croissance sont marqués par les changements biochimiques suivants :

1) dans les cotylédons la teneur en azote soluble augmente en général pendant les cinq premiers jours de la germination, alors que la concentration en azote protéinique baisse fortement, tout comme - dans une moindre mesure - celle de l'azote total;

2) dans l'axe embryonnaire les premiers jours se caractérisent par une augmentation de la teneur en eau, des glucides, de l'azote soluble, de l'azote α-aminé et des acides nucléiques par rapport à l'unité de poids; inversément la teneur en azote protéinique diminue pendant la même période;

3) si d'une manière générale les concentrations des AA sont assez différentes, les variations en fonction de la durée de la croissance sont assez parallèles;

4) on soupçonne un rôle actif de l'arginine dans la stimulation de la croissance initiale.

Nos résultats sur les jeunes racines de Lentille montrent l'évolution du poids, de l'azote soluble et insoluble à l'éthanol (70%) ainsi que celle des AA libres et protéiniques. Tout comme PILET (1960) et COLLET (1962), nous avons préféré le critère plus adéquat de l'âge physiologique à celui de l'âge chronologique et les mesures ont été effectuées sur des lots de racines ayant une longueur de respectivement 3 - 6 - 9 - 12 - 18 - 26 et 36 mm.

1.2. Résultats

1.2.1. Le poids et l'azote

Les valeurs du poids frais et du poids sec ainsi que les teneurs en azote soluble et insoluble, exprimées selon deux critères différents, sont portées dans le tableau XXII. Le poids frais et le poids sec augmentent de façon constante avec l'allongement des racines. Le rapport poids frais/poids sec indique toutefois que le poids frais augmente plus entre 3 et 18 mm, ce qui confirme les observations ci-dessus selon lesquelles les jeunes racines ont tendance à augmenter leur teneur en eau durant les premiers jours de croissance. La teneur en azote soluble par rapport au poids sec augmente depuis les racines de 3 mm jusqu'à celles de 12 mm; à 18 mm elle diminue légèrement et elle se stabilise ensuite. La concentration de l'azote insoluble diminue régulièrement en fonction de la longueur. En faisant la somme de l'azote soluble et de l'insoluble, on obtient les teneurs en azote total qui sont les plus élevées par rapport au poids sec dans les racines les plus jeunes.

Concernant les valeurs d'azote obtenues à partir de matériel étiolé tel que le nôtre, nous rappelons la remarque déjà faite pour les valeurs augmentées des AA libres (chap.II.4.1.). GANGULI (1955), SHIRAKAWA et OTOKARA (1956), VICKEREY (1956) ainsi que STEWARD et DURZAN (1965) ont fait des observations similaires pour les teneurs en azote soluble, tout comme pour la baisse simultanée de la teneur en azote non soluble. Pour cette dernière forme, seul SIEGENTHALER (1963) relève une légère augmentation lors de la culture à l'obscurité.

Les teneurs d'azote exprimées par rapport à 100 racines augmentent assez régulièrement comme prévu. Pourtant les proportions d'azote soluble et non soluble changent fortement en fonction de la

TABLEAU XXII

Valeurs du poids frais, du poids sec, de l'azote soluble et insoluble, et du rapport de ces valeurs pour les racines de Lentille en relation avec la longueur totale (en mm)

L (mm)	3	6	9	12	18	26	36
PF (g/100 r)	0,31	0,50	0,81	1,31	1,83	2,37	2,99
PS (mg/100 r)	49,41	63,88	102,25	132,14	180,45	257,85	310,45
PF/PS (g/g)	6,27	7,83	7,92	9,91	10,14	9,19	9,63
mg Ns/100mg PS	1,21	1,77	2,52	2,60	2,49	2,57	2,59
mg Nns/100mg PS	4,70	3,98	2,59	2,58	1,98	1,85	1,76
mg Ntot/100mg PS	5,91	5,75	5,11	5,18	4,47	4,42	4,35
Ns/Nns	0,26	0,44	0,97	1,01	1,26	1,39	1,47
mg Ns/100 r	0,60	1,13	2,58	3,44	4,49	6,63	8,04
mg Nns/100 r	2,32	2,54	2,65	3,41	3,57	4,77	5,46
mg Ntot/100 r	2,92	3,67	5,23	6,85	8,06	11,40	13,50

L : longueur des racines
PF : poids frais
PS : poids sec
Ns : azote soluble à l'éthanol 70%
Nns : azote non soluble à l'éthanol 70%
Ntot : somme de l'azote soluble et non soluble
r : racine

longueur : dans les racines de 3 mm ce rapport est de 0,26; dans celles de 36 mm il est presque six fois plus élevé. Tout comme pour les rapports des poids frais et sec, les variations par mm d'allongement sont les plus importantes pour les racines les plus jeunes et elles s'atténuent ensuite progressivement.

1.2.2. Les acides aminés libres

Les courbes de variation des concentrations en AA libres par rapport à la longueur constituent les Fig. 19 A, B, C, D, où les AA ont été répartis selon leur acidité décroissante.

En général les concentrations augmentent fortement à partir des racines de 3 jusqu'à 12 mm de longueur. Entre 12 et 18 mm on note une relative constance des valeurs ou une diminution. Après 18 mm, les valeurs ne changent plus beaucoup. Quelques AA s'écartent cependant de cette tendance : l'acide aspartique dont la concentration reste relativement constante pour les racines de toutes les longueurs, la proline dont les valeurs baissent fortement entre 18 et 36 mm, l'asparagine dont la teneur continue à augmenter en fonction de la longueur. L'arginine et dans une moindre mesure l'acide glutamique et le pic no. 40 vont à l'encontre de la tendance initiale, car leur concentration est la plus importante pour les racines de 3 mm, ensuite elle diminue jusqu'aux racines longues de 18 respectivement de 12 mm après quoi elle reste assez constante.

Concernant les valeurs absolues, l'asparagine est le composé de loin le plus concentré pour toutes les racines. Nous verrons après que ceci est en rapport avec la culture à l'obscurité et avec son rôle de fournisseur d'azote. D'autres concentrations élevées sont celles de la valine, de la thréonine, de la sérine, ainsi que celles de certains peptides acides. Pour les teneurs importantes et parfois changeantes

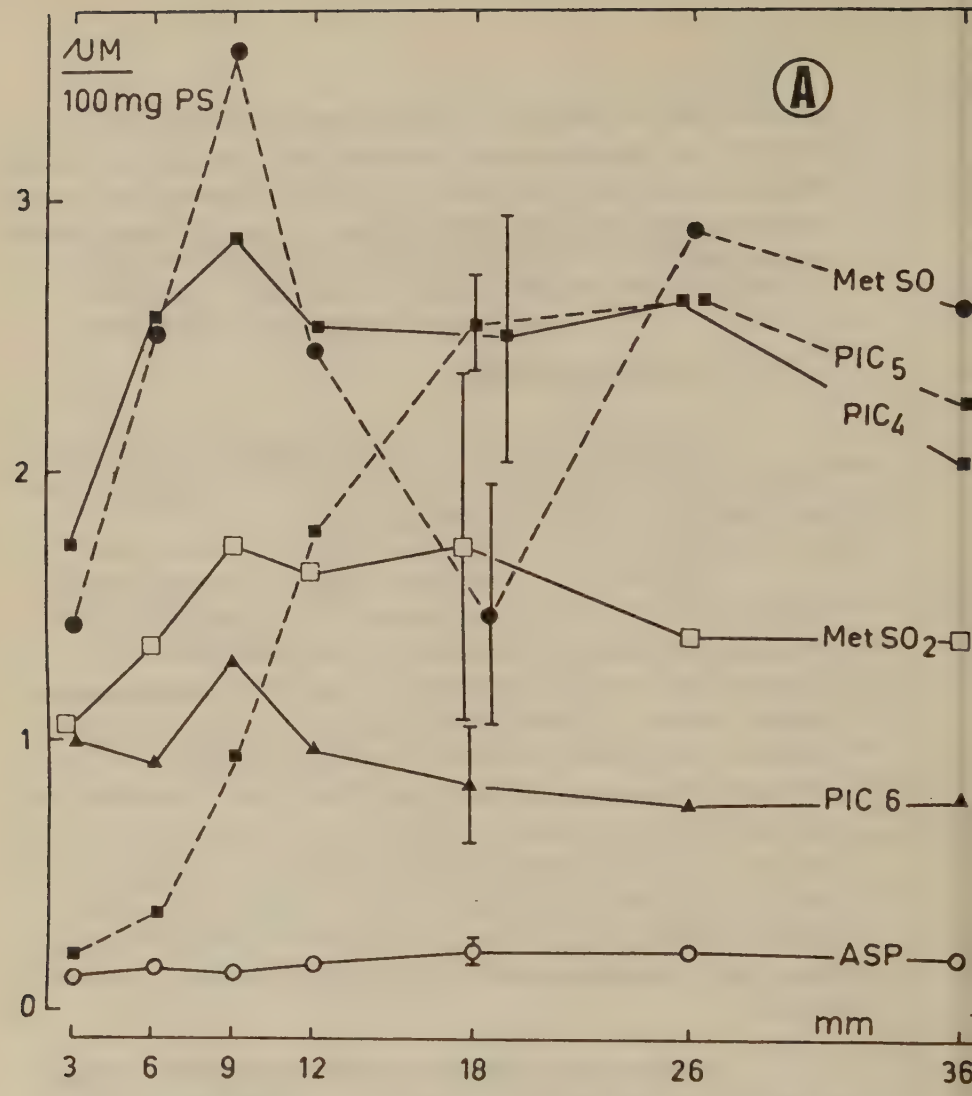


FIGURE 19

Variations des acides aminés libres des racines de Lentille en relation avec la longueur totale (en mm).

La ligne verticale correspond à l'intervalle de confiance à 95%.

A : Fraction acide

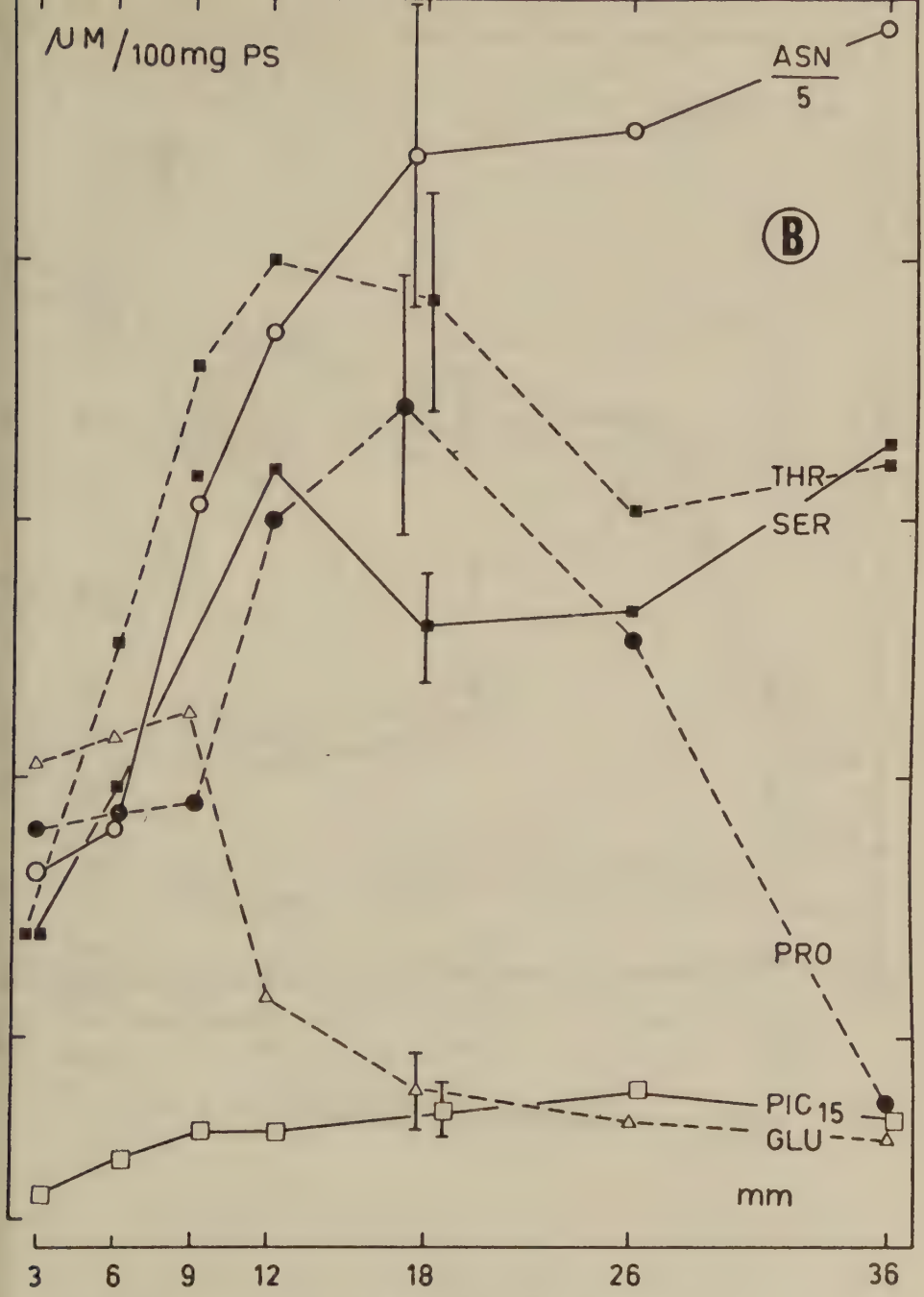


FIGURE 19 B : Fraction acide à neutre (voir Fig 19 A)

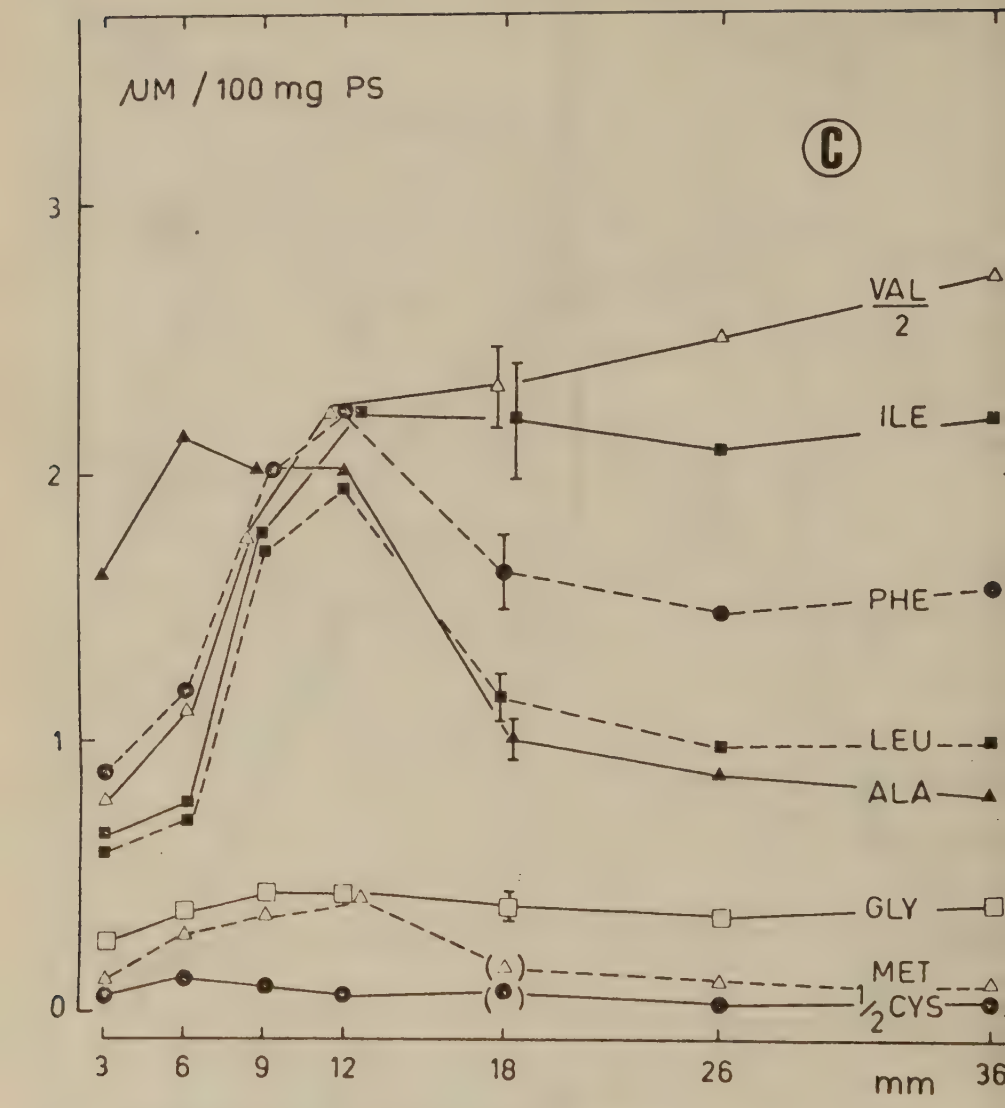


FIGURE 19 C : Fraction neutre (voir Fig 19 A)

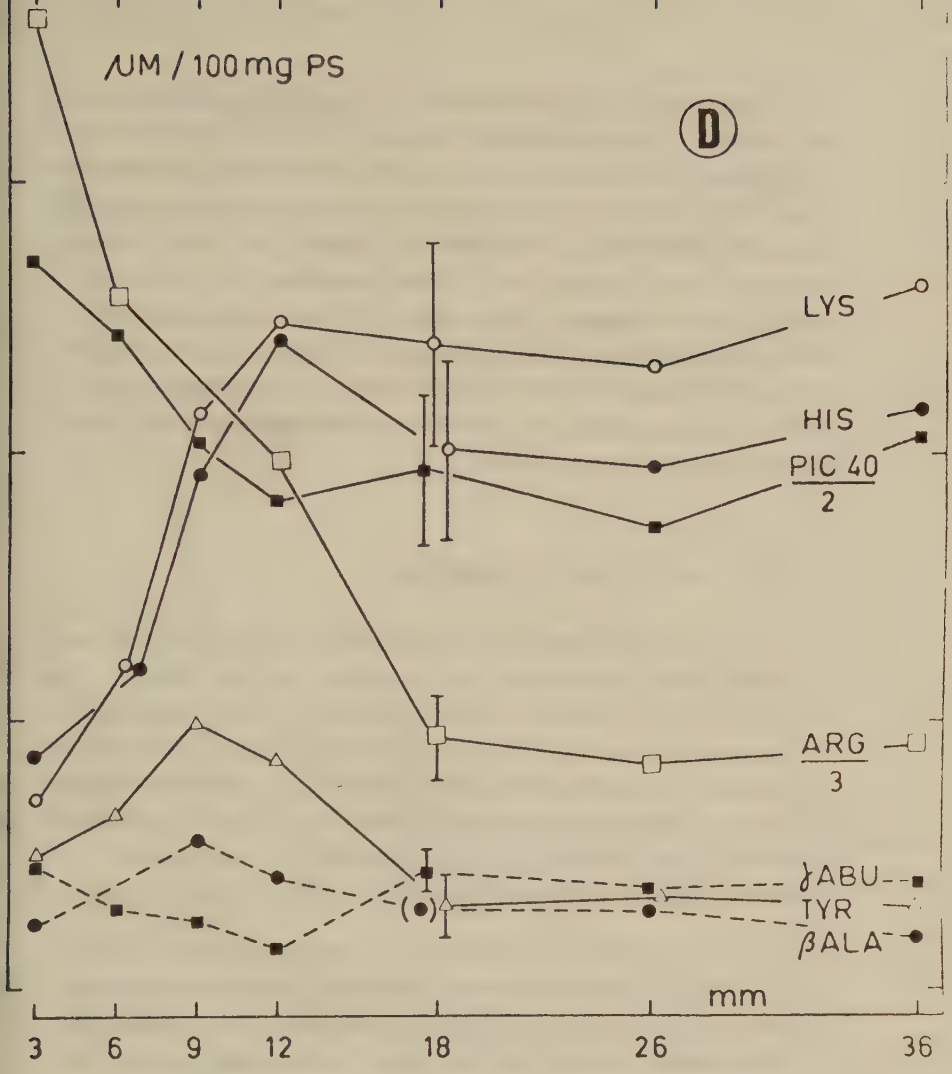


FIGURE 19 D : Fraction basique (voir Fig 19 A)

de la méthionine sulfoxyde et sulfone, il faut admettre qu'une partie se trouvait à l'état oxydé dans la plante et que le reste résulte de l'oxydation plus ou moins forte de la méthionine durant les manipulations. Inversément on trouve des concentrations faibles d'acide aspartique, de méthionine, de β-alanine, de tyrosine, de l'acide γ-aminobutyrique, de la glycine et de l'acide glutamique. Pour les acides aspartique et glutamique, cette constatation est assez surprenante étant donné qu'ils se forment directement à partir du cycle citrique en activité intense à ce stade de croissance. La méthionine et la β-alanine par contre sont des acides aminés généralement peu concentrés dans les jeunes plantes.

1.2.3. Les acides aminés protéiniques

Les AA obtenus après l'hydrolyse du culot éthanolique sont de concentration très élevée dans les racines les plus jeunes (Fig. 20 A, B, C). Ensuite la teneur diminue fortement en fonction de la longueur jusqu'au stade de 9 mm et dans une moindre mesure jusqu'à 26 mm, après quoi elle remonte légèrement pour les racines récoltées à 36 mm. Uniquement dans ces dernières apparait un petit pic d'hydroxyproline. Pour l'ensemble des AA protéiniques, on remarque un parallélisme assez rigoureux des teneurs en fonction de la longueur.

L'examen des valeurs absolues entre elles révèle que les proportions des concentrations sont nettement différentes de celles des acides AA. Ainsi les contributions importantes de la valine, de la sérine et de la thréonine libres ainsi que des AA riches en azote ne se retrouvent pas dans les AA protéiniques. Inversément, les teneurs en acide aspartique, glutamique et en glycine sont les plus élevées de cette dernière fraction.

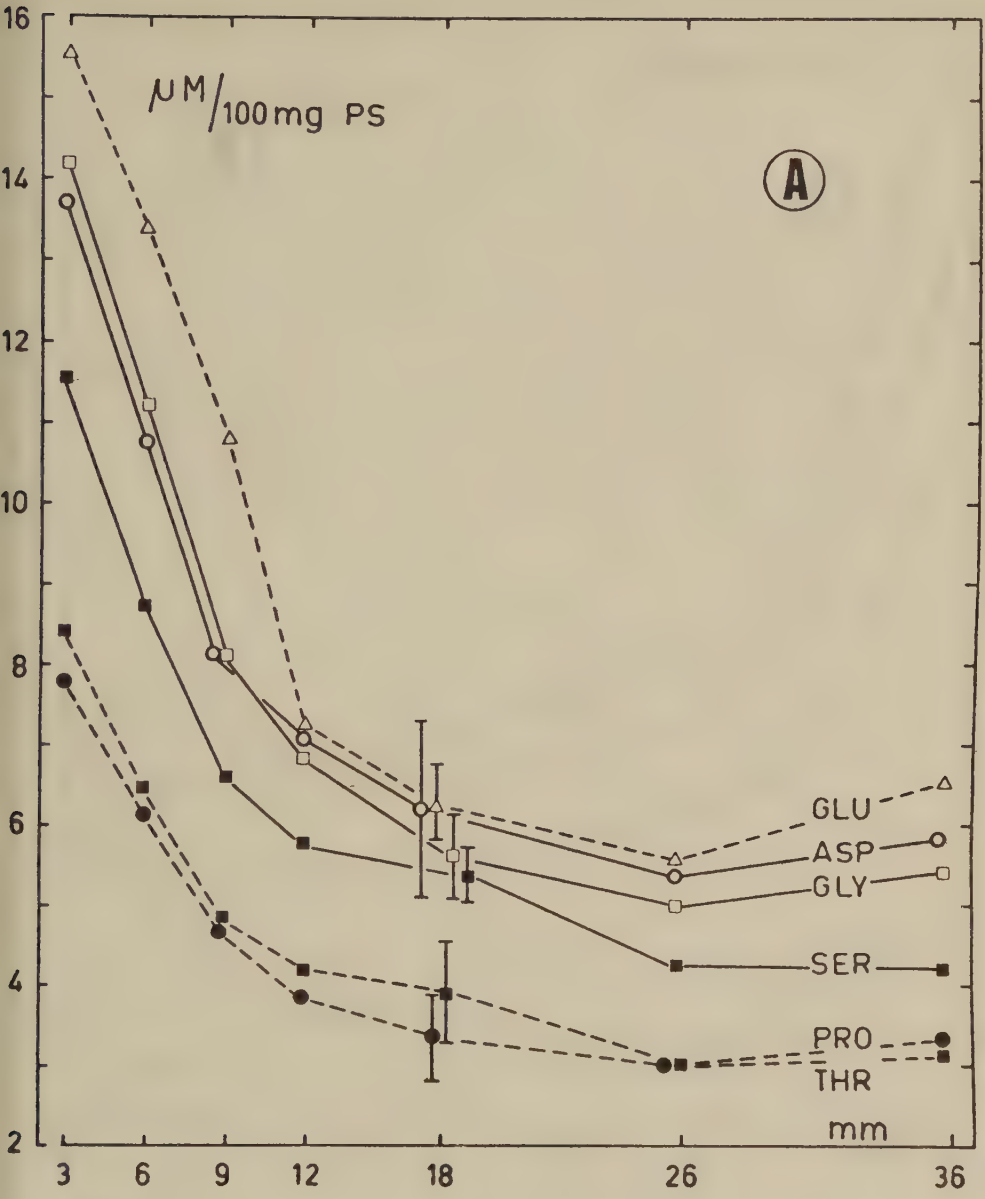


FIGURE 20

Variations des acides aminés protéiniques des racines de Lentille en relation avec la longueur totale (en mm).

La ligne verticale correspond à l'intervalle de confiance à 95%.

A : Fraction acide

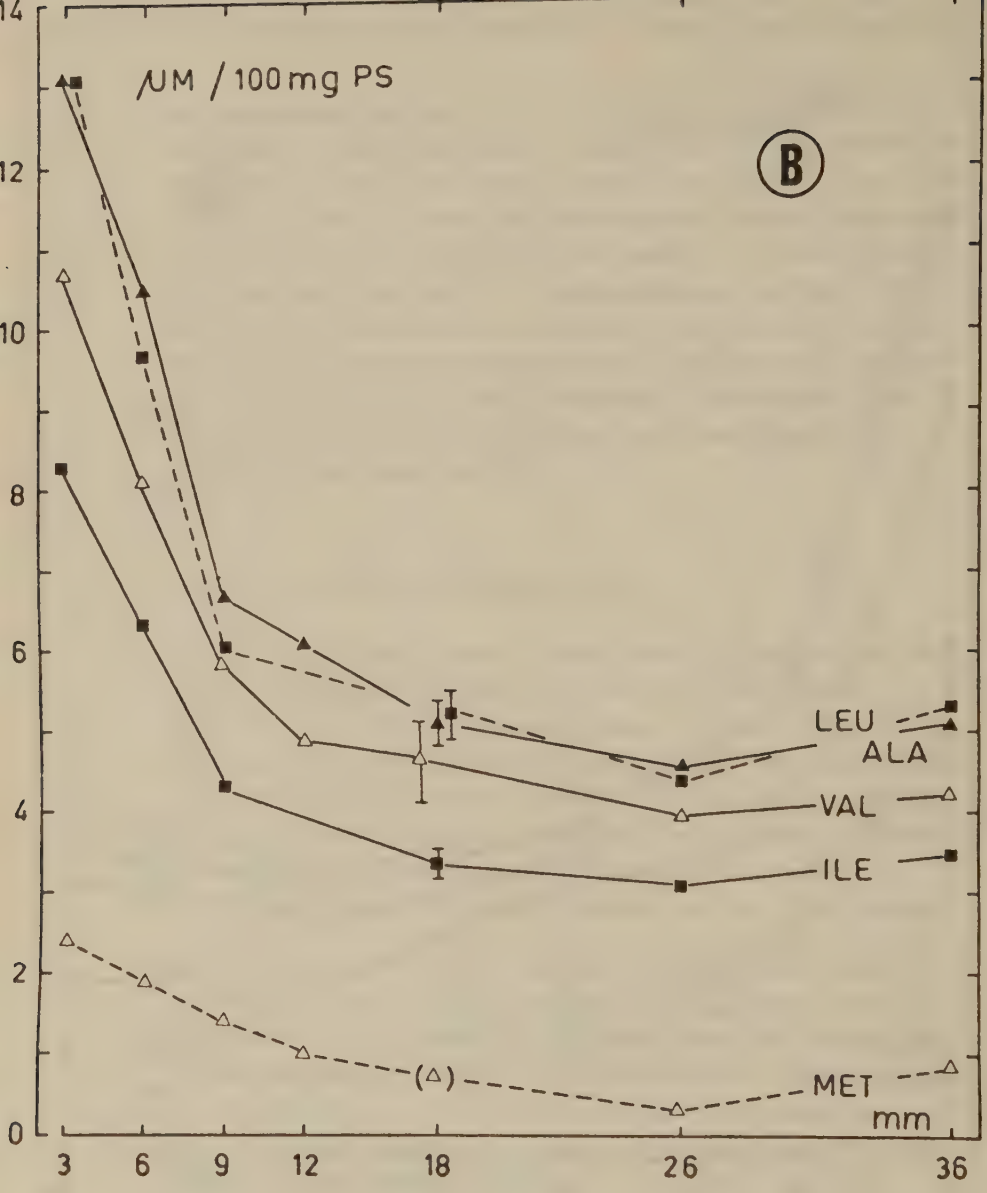


FIGURE 20 B : Fraction neutre (voir Fig 20 A)

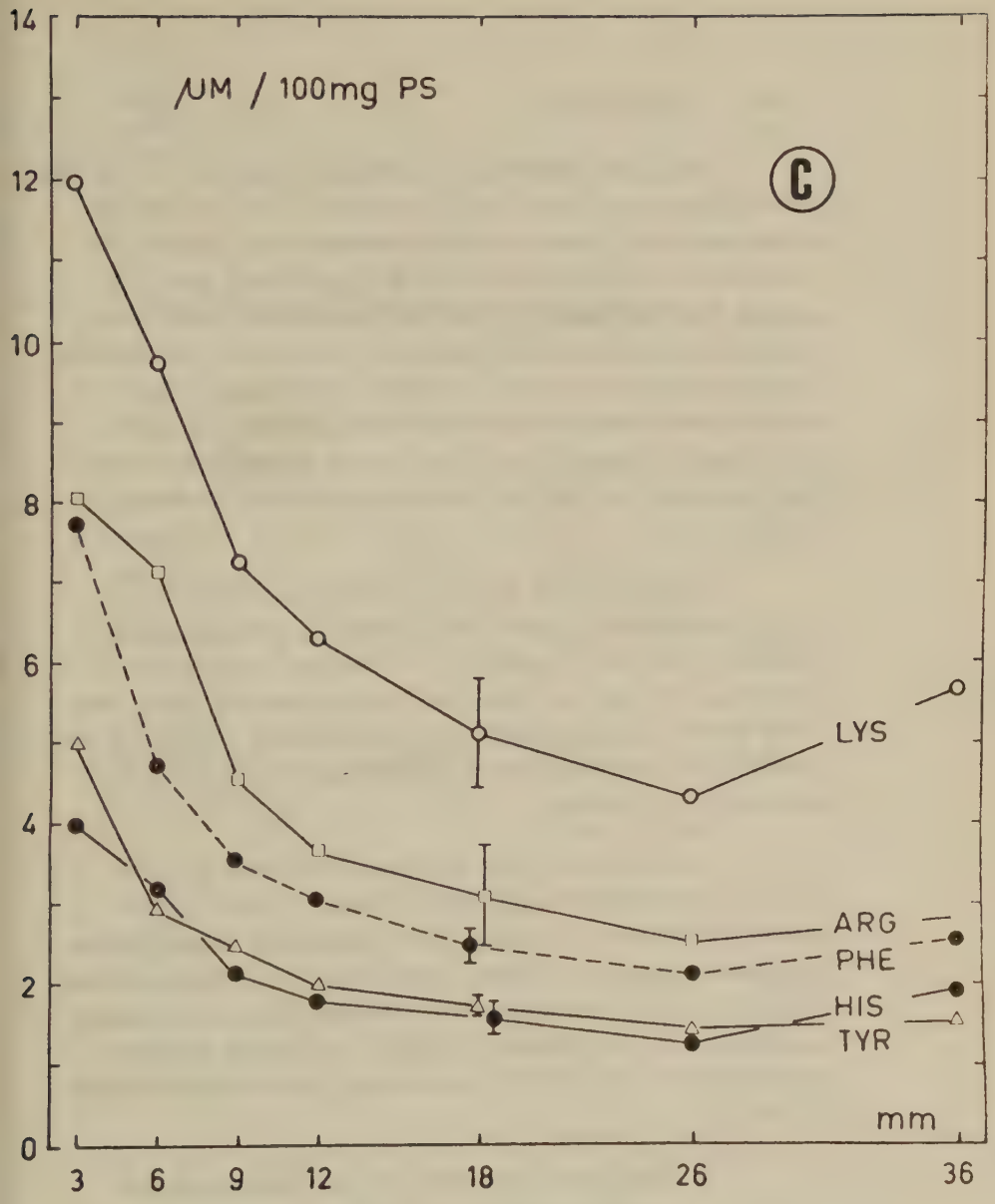


FIGURE 20 C : Fraction basique (voir Fig 20 A)

1.2.4. Bilans d'azote

Nous avons annoncé que les extraits (chap. II.4.2.) et les culots éthanoliques (chap. I.B.2.) contiennent d'autres composés azotés que les AA libres ou liés en protéines et en peptides. La preuve en est faisable par un bilan de l'azote aminé. Pour nos racines nous connaissons en effet les concentrations en AA, auxquelles il est possible d'additionner la partie azotée. Cette somme est alors comparée à la teneur en azote soluble total du même extrait, respectivement à celle de l'azote insoluble, du culot analysé selon Kjeldahl. Ces bilans, dressés d'après des valeurs des tableaux XIII et XXII pour les racines de 18 mm, figurent au tableau XXIII.

Le premier bilan concernant l'azote soluble révèle que 53,41 % seulement de l'azote soluble total est constitutif des acides AA identifiés et quantifiés. Or, une partie importante du pourcentage résiduel fait partie des peptides extraits et des composés inconnus du chromatogramme. Quoique inconnus, on sait que ces composés contiennent au moins un groupement aminé parce qu'ils réagissent à la ninhydrine.

Il en résulte que ce premier bilan est fort incomplet. Nous avons donc essayé de dresser un deuxième bilan de l'azote soluble par la somme de l'azote des AA ci-dessus et la contribution en azote des peptides, des pics inconnus et des pic mentionnés sous forme de "traces". Pour calculer la teneur en azote de ces composés peu définis, il était nécessaire d'établir plusieures hypothèses quant à leur réactivité à la ninhydrine et à leur composition moléculaire :

1) l'équivalent norleucine des pics inconnus et des peptides est posé égal à un. Cette valeur correspond environ à celle que nous avons trouvée pour le gluthation

TABLEAU XXIII

Calcul du bilan azoté pour les racines de Lentille (18 mm)

	Extrait	Hydrolysat	Racine entière
N total (mg/100mg PS)	2,49	1,98	4,47
N α-aminé (% de N total)	53,41	62,63	57,49
N réagissant à la ninhydrine (% de N total)	91,57	62,63	78,75

N : azote

2) nous supposons que les peptides extraits sont constitués en moyenne de 4,5 AA, par comparaison avec les deux peptides isolés dans les racines de Mais (chap.III.C.3.4.), tout en tenant compte de la solubilité préférentielle des di-, tri- ou tétrapeptides.

On peut en effet admettre que des chaînes peptidiques plus longues s'extraient de moins en moins bien à l'éthanol et qu'elles se retrouvent dans le culot. En comptant un atome d'azote par AA constitutif, on a 4,5 atomes d'azote par molécule de peptide;

3) à chaque composé inconnu nous attribuerons un nombre d'atomes d'azote intermédiaire à celui des deux AA qui l'entourent dans le chromatogramme. La place du composé inconnu y est en effet en relation directe avec sa basicité à laquelle contribue essentiellement le nombre d'atomes d'azote;

4) aux petits pics cités sous forme de "traces", on attribue une concentration de 0,1 µM/100 mg PS, par comparaison aux pics légèrement plus grands et calculables.

D'après ce bilan d'estimation, la part de l'azote aminé au sens large ci-dessus est de 91,57 % de l'azote soluble total. Quoique cette valeur soit fort arbitraire, elle n'est pas dépourvue d'intérêt. LAWRENCE et coll. (1959) ont effectué un fractionnement de l'azote soluble à l'éthanol 70 % de racines de pois. Sans analyser les AA, ces auteurs ont soumis l'extrait à des réactions spécifiques pour l'azote sous forme d'AA, d'amides, d'ammoniaque, d'urée et de peptides libres. On peut calculer qu'ils retrouvent ainsi environ 70 % de l'azote soluble total. Le reste serait constitué d'iminoacides, de β-amino-acides, d'acide pipécolique, de chlorophylle, de bases puriques et pyrimidiques ainsi que de diverses vitamines du groupe B contenant de

l'azote. Pour nos échantillons, les iminoacides et les β-aminoacides sont comprises dans les bilans; d'autre part, l'acide pipécolique (surcharge) et la chlorophylle (obscurité) sont absentes, de sorte que notre estimation est assez réaliste en admettant qu'environ 90% des substances azotées solubles à l'éthanol réagissent à la ninhydrine et comportent de ce fait un ou plusieurs groupements aminés ou iminés.

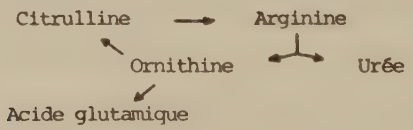
Le troisième bilan non moins intéressant est celui de l'azote provenant de l'hydrolyse des protéines. Le calcul, basé sur les chiffres des tableaux XIV et XXII, est plus simple, car seule la cystine était mentionnée sous forme de "traces" relativement importantes, de sorte que l'on peut estimer sa valeur à 0,5 µM/100 mg PS. Dans ce culot hydrolysé, on ne retrouve que 62% de l'azote sous forme aminée, le reste étant constitué par les autres composés azotés abondants dans les tissus jeunes. Nous ne citerons que les acides nucléiques (WANG 1973) dont la synthèse se produit parallèlement à celle des protéines (POLKES et YEMM 1958 a) et dont surtout les méristèmes de la racine de Lentille sont très riches (PILET et BRAUN 1970). Il y a encore les composés azotés insoluble revus par SYNGE (1968) : les débris des parois et des organelles cellulaires et les quantités plus faibles d'azote lié à des alcaloides, des glucides des auxines, etc..

Notons que dans le prochain sous-chapitre, les bilans de l'azote aminé ont été repris sous forme graphique et détaillées pour les différentes zones de la racine de 18 mm.

1.3. Discussion

Contrairement à ce que l'on avait initialement pensé, les AA ne sont pas tous destinés à la protéosynthèse, mais ils constituent pour une large part un substrat de respiration et une réserve riche en azote en vue de l'élaboration de bases nucléiques. Nous trouvons

en effet à la figure 21 C des taux élevés en AA basiques tels que la lysine, l'histidine, le pic 40 et l'arginine qui contiennent tous entre deux et quatre atomes d'azote par molécule. La courbe descendante de l'arginine mérite d'ailleurs une attention spéciale : elle est en effet avec le pic 40 (dans une moindre mesure), de pente contraire à tous les autres AA libres. Ce composé et parfois l'asparagine ou la glutamine (respectivement leurs formes acide, suite à l'hydrolyse) sont présents en des concentrations élevées dans les protéines de réserve (FOLKES et YEMM 1956; ARONOFF 1962; STEWARD et DURZAN 1965), notamment dans les globulines (BOULTER 1973). GUTTION (1964) ainsi que KOEHLER et BORRIS (1967) observent déjà lors de l'imbibition de la graine une activation de l'arginase. D'après GUTTION (1964), l'arginine dans l'embryon donne ainsi naissance à l'urée et à l'onithine.



Le schéma montre que la formation de l'ornithine peut conduire soit au bouclage du cycle de KREBS-HENSELEIT (1932) ou à la formation d'acide glutamique. Or, dans nos chromatogrammes, l'ornithine et l'urée n'apparaissent que sous forme de traces et la citrulline n'a pu être détectée. Ceci nous amène à confirmer l'hypothèse de l'auteur ci-dessus, que la durée de vie de ces métabolites est très courte et que probablement les transformations ont lieu surtout dans la direction de l'acide glutamique et de l'urée. Nous verrons plus tard l'importance biochimique de l'acide glutamique, notamment par les réactions de transamination, alors que l'urée est susceptible de fournir des groupements $-NH_2$ aux plantes embryonnaires. La présence de beaucoup d'arginine est donc fondamentale pour la croissance de la plante embryonnaire.

Parmi les composés susceptibles de fournir de l'azote à l'embryon, nous avons également mentionné l'asparagine et la glutamine. Par leur groupement amidique, ces molécules renferment également deux atomes d'azote. L'asparagine - qui ne commence à se manifester dans l'embryon qu'après la percée de la radicule (KOEHLER et BORRIS 1967) - se présente progressivement en des teneurs extrêmement élevées, ce qui a été observé dans d'autres travaux sur du matériel en germination par ARONOFF (1962), LAWRENCE et GRANT (1963) ainsi que par INGVERSEN et IVANKO (1971). En revanche, la glutamine n'est présente que sous forme de traces dans les racines de Lentille (Tab. XIII).

La grande différence de concentration entre ces deux amides semble imputable au mode de culture à l'obscurité qui est propice à la formation d'asparagine (MAC KEE 1950; ARONOFF 1962), alors que la formation de la glutamine est tributaire de la photosynthèse. Pour des feuilles de Menthe, STEWARD et DURZAN (1965) montrent en effet que ces deux amides varient en sens opposé en fonction de l'éclairement. A part la possibilité de fournir de l'azote, le rôle de cet amide comme celui de la majorité des AA non protéiniques demeure peu élucidé (FOWDEN 1973) et il n'est pas exclu que l'asparagine non métabolisée rejoigne assez rapidement le pool inactif des acides aminés (STEWARD et BIDWELL 1962).

L'acide glutamique et l'acide aspartique, autres AA répandus dans les globulines et les albumines de réserve, méritent également une attention spéciale. A l'état libre, ces deux AA ne sont présents qu'à des concentrations étonnamment basses (exception faite pour l'acide glutamique des racines de 3 à 9 mm où la concentration atteint la moyenne de celle des autres acides aminés). Dans les hydrolysats de protéines par contre, ils sont parmi les AA les plus concentrés, ce qui indique qu'ils seraient inclus de façon préférentielle dans les nouvelles protéines de la racine. Il n'est pas que ces deux AA, quoique libérés en des quantités relativement importantes depuis les

cotylédons, n'aient qu'une durée de vie très limitée à l'état libre dans la racine. Une partie serait englobée telle quelle dans la protéosynthèse très active (qui peut se dérouler en l'espace de quelques minutes seulement); une autre partie servirait à la synthèse d'autres AA, surtout par transamination avec les substances du cycle citrique. Mais ces deux AA semblent également fort impliqués dans les réactions de respiration : LARSON et BEEVERS (1965) qui administrent respectivement de l'acide aspartique et de l'acide glutamique radioactifs aux cotylédons de différents lots de Pois, trouvent déjà après 24 h environ 40% du ^{14}C sous forme de CO_2.

Une durée de vie courte à l'état libre semble également attribuable à la glycine que l'on retrouve principalement dans les protéines de nos racines. Il convient de citer ici une expérience intéressante de FRIES (1953) qui cultive des germes de pois sur un milieu nutritif d'agar. Après avoir sectionné les cotylédons, les jeunes plantes cessent pratiquement de pousser. C'est seulement après l'addition de glycine, d'arginine et d'adénine que la croissance reprend. L'auteur en conclut que ces trois composés sont indispensable dans le flux de matière organique qui provient des cotylédons. La glycine, une fois libérée, semble donc immédiatement engagée dans l'anabolisme des jeunes tissus. D'après l'auteur ci-dessus, l'arginine connaîtrait un sort semblable à celui de la glycine, seulement sa concentration serait tellement importante après la germination qu'au début une grande partie subsisterait à l'état libre dans la racine.

L'AA qui varie le plus en fonction de la longueur est la proline libre. Présente en des concentrations très faibles pour les racines de 3 mm, la teneur augmente fortement jusqu'aux racines de 18 mm et rediminue ensuite en fonction de la longueur. Comme nous l'avons mentionné au début, certains auteurs considèrent sa concentration comme un indicateur de sécheresse des tissus. Or, cette dernière est constante dans nos cultures. BARNARD et OAKS (1970) cependant,

suivent l'évolution de la proline libre dans les jeunes racines de Maïs où une concentration élevée est, selon ces auteurs, caractéristique de cellules en croissance rapide. A cet égard, notre courbe de concentration de proline libre se superpose bien à celle de la vitesse de croissance établie par PILET et NOUGARÈDE en 1967 pour un matériel similaire.

Nous avons déjà souligné ci-dessus les grandes différences de concentration de la plupart des AA suivant qu'ils appartiennent à l'extrait ou au culot éthanolique. Ce déséquilibre entre les AA disponibles et ceux liés en protéines renforce l'idée que les AA libres ont également et peut-être surtout d'autres rôles que de servir de maillons de chaîne à la protéosynthèse. Ceci avait été remarqué en 1958 déjà lors d'une synthèse du problème par FOLKES et YEMM (a). Pour ces auteurs, de nombreux AA dans la cellule n'étaient pas en équilibre avec le site de la synthèse protéinique, et cette dernière était plus en rapport avec les glucides de la cellule qu'avec le pool des AA libres. Dans cet ordre d'idées, nous ne citerons que l'intervention de la glycine, de l'acide aspartique, de la glutamine et de l'ammoniaque dans la synthèse des nucléotides et des acides nucléiques (IGLE et coll. 1963; WANG 1973) et le rôle déjà cité de substrat à la chaîne respiratoire (ZIEGLER 1961).

Pour les AA libres non protéiniques, les connaissances actuelles sont toujours très réduites. En dehors du rôle de fournisseur d'azote des AA basiques, FOWDEN (1973) soupçonne une intervention de la glutamine et des dérivés de l'acide glutamique dans le transport de l'azote et à d'autres composés aminés libres il attribue, tout comme MARTIN et THIMAN (1972), un rôle possible d'antimétabolite par blocage de sites de la protéosynthèse. Mais une véritable fonction biologique des AA non protéiniques n'est pas encore mise en évidence et en général on s'accorde pour reléguer ces composés dans le "pool non métabolique" qui traduit un peu notre ignorance à ce sujet.

2. GRADIENTS DE RACINES DE 18 MM

2.1. Introduction

PILET et NOUGAREDE (1965 et 1967) ont montré la structure histologique hétérogène de racines de Lentille à 18 mm. Jusqu'à présent, PILET et de nombreux collaborateurs ont déjà établi une série de gradients essentiellement biochimiques sur ce matériel, ce qui a permis d'établir de nombreux parallèles entre la structure et le rôle physiologique qui en découle.

Parmi les gradients établis sur les racines de Lentille, nous retenons : le gradient du nombre de cellules et celui des sucres réducteurs établis par PILET et MEYLAN en 1953, celui de l'amidon par PILET et MARGOT (1953), celui du quotient respiratoire (PILET et KOBR 1959), la répartition des groupes sulfhydriles et du soufre total (PILET 1957 c; PILET et ZRYD 1965; ZRYD 1969), le gradient des auxines et de l'activité auxine-oxydasique (PILET et NOUGAREDE 1967), la distribution de l'activité de la RNase (PILET et BRAUN 1970), ainsi que le gradient de l'azote soluble et insoluble à la solution d'acide trichloracétique à 10% (PILET et SIEGENTHALER 1959; SIEGENTHALER 1963).

Ailleurs, d'autres gradients en rapport avec l'azote, les protéines ou les enzymes ont été établis sur différents matériels racinaires. Nous n'en citerons que les plus importants : WANNER (1950), MORGAN et REITH (1954) qui distinguent entre l'azote α-aminé des protéines, des peptides et des AA libres. BROWN et BROADBENT (1950), LAWRENCE et coll. (1959) ainsi que STEWARD et coll. (1965) travaillent sur les racines de Pois, pour lesquels les derniers auteurs établissent des électrophorégrammes de protéines.

Pour les racines de Haricot et de Mais, ROBINSON et BROWN (1952) ainsi que KOHL (1971) tracent les gradients de plusieurs enzymes. JENSEN (1955) détaille les teneurs en azote soluble et insoluble spécialement pour les apex de Haricot.

Concernant les gradients d'AA, nous n'avons pas connaissance de travaux détaillés. Seuls LAWRENCE et GRANT (1963) ont fait une étude des germes de Pois, qui distingue entre les AA de l'apex racinaire et ceux de l'axe.

Si l'on rapporte les valeurs en fonction du poids sec, on peut résumer les observations ci-dessus de la manière suivante : dans la région apicale de la racine, la teneur en azote insoluble ou protéinique est très élevée. Elle diminue ensuite fortement et reste relativement constante dans le reste de la racine. Le taux en azote soluble est très faible dans l'apex, ensuite il monte régulièrement jusqu'au collet. Après les nombreux gradients déjà établis ci-dessus, nos gradients d'azote détaillés pour les AA devraient contribuer à mieux interpréter les relations entre la structure histologique et le rôle physiologique des tissus, ainsi qu'à compléter les conclusions du sous-chapitre précédent.

2.2. Préparation du matériel

Après la mise en culture (chap.I.A.1.1.), les racines de 18 $\pm$ 0,5 mm sont excisées et coupées par groupes de six sur la guillotine décrite par PILET (1959). Cette dernière donne pour chaque racine six segments différents de 3 mm de longueur. A partir de l'apex, ils correspondent aux zones de 0-3, 3-6, 6-9, 9-12, 12-15 et 15-18 mm. Tous les segments de même zone sont groupés et récoltés comme nous l'avons décrit au chapitre I.A.3..

2.3. Résultats

2.3.1. Le poids et l'azote

Le poids frais et le poids sec augmentent en général depuis la première jusqu'à l'avant-dernière zone (Tab. XXIV). Seul le poids sec de la zone 3-6 mm est légèrement plus bas que celui de la zone précédente. La dernière zone représente à nouveau un poids frais et un poids sec plus bas. Il est probable que cette dernière variation est partiellement due à une perte par exsudation de composés solubles. Celle-ci affecterait spécialement l'extrémité excisée de la racine. Le rapport entre le poids frais et le poids sec est le plus bas pour la première zone. Il est le plus élevé pour la deuxième zone à partir de laquelle il ne cesse de décroître jusqu'au collet.

Les valeurs d'azote soluble augmentent régulièrement jusqu'à la zone 12-15mm. Pour la dernière zone, la teneur diminue d'environ 10%. L'azote non soluble est représenté par une concentration très élevée dans l'apex, à partir de la deuxième zone, la concentration diminue très fortement et elle varie ensuite d'une façon quelque peu irrégulière. La teneur en azote total, obtenue par la somme des deux composantes ci-dessus, est la plus élevée dans la première zone et la moins élevée dans la deuxième zone. Pour les autres zones, elle ne présente pas une tendance bien définie.

Le rapport azote soluble/azote non soluble n'est que de 0,19 dans l'apex et il évolue par étapes jusqu'à 1,73. Cette évolution rend bien compte de la grande différence qualitative de l'azote le long de la racine.

TABLEAU XXIV

Valeurs du poids frais, du poids sec, de l'azote soluble et insoluble, et du rapport de ces valeurs le long de l'axe de la racine de Lentille (de 0 à 18 mm)

Zones (mm)	0-3	3-6	6-9	9-12	12-15	15-18
PF (mg/100 r)	144,0	248,1	336,4	367,2	413,9	310,2
PS (mg/100 r)	16,9	15,6	23,6	27,6	31,5	26,6
PF/PS (g/g)	8,52	15,90	14,25	13,30	13,14	11,66
mg Ns/100mg PS	1,12	1,86	2,55	2,90	3,36	3,06
mg Nns/100mg PS	5,79	2,09	1,95	1,68	1,80	1,78
mg Ntot/100mg PS	6,91	3,95	4,50	4,58	5,16	4,84
Ns/Nns	0,19	0,89	1,31	1,73	1,87	1,72

PF : poids frais
PS : poids sec
Ns : azote soluble à l'éthanol 70%
Nns : azote non soluble à l'éthanol 70%
Ntot : somme de l'azote soluble et non soluble
r : racine

2.3.2. Les acides aminés libres

Nos gradients d'AA libres qui sont portés dans les figures 21 A, B, C indiquent des concentrations extrêmement faibles dans la région apicale, suivies d'une forte augmentation jusqu'à la zone 6-9 mm. Après, l'augmentation est nettement moins importante et au collet on remarque même des diminutions de certains AA. Tel est notamment le cas de la valine, de l'isoleucine, de la lysine et de l'histidine dont les concentrations de la dernière zone sont nettement inférieures à celles de l'avant-dernière.

Notons que les rapports de concentration entre les dernières zones et la première sont en moyenne d'environ 5:1. Celui de la proline par contre n'est que d'environ 2:1, ce qui révèle une concentration relativement élevée dans la première zone par rapport aux dernières.

Deux AA font exception à la tendance générale: l'acide glutamique et son produit de décarboxylation, l'acide γ-aminobutyrique sont plus concentrés dans la première zone que dans les autres. Nous y voyons déjà un certain (parallélisme avec leurs concentrations en fonction de la longueur de la racine.

2.3.3. Les acides aminés protéiniques

Les courbes des figures 22 A, B, C représentent les teneurs des AA protéiniques le long de l'axe racinaire. Toutes les concentrations de la région apicale sont environ trois fois plus élevées que celles des autres zones. A partir de la deuxième zone jusqu'au collet, les valeurs sont relativement constantes et les tracés sont de nouveau d'un parallélisme remarquable, tout comme ceux obtenus en fonction de la longueur des racines. Contrairement aux AA libres, le dernier segment ne présente plus de valeurs différentes de l'avant-dernier.

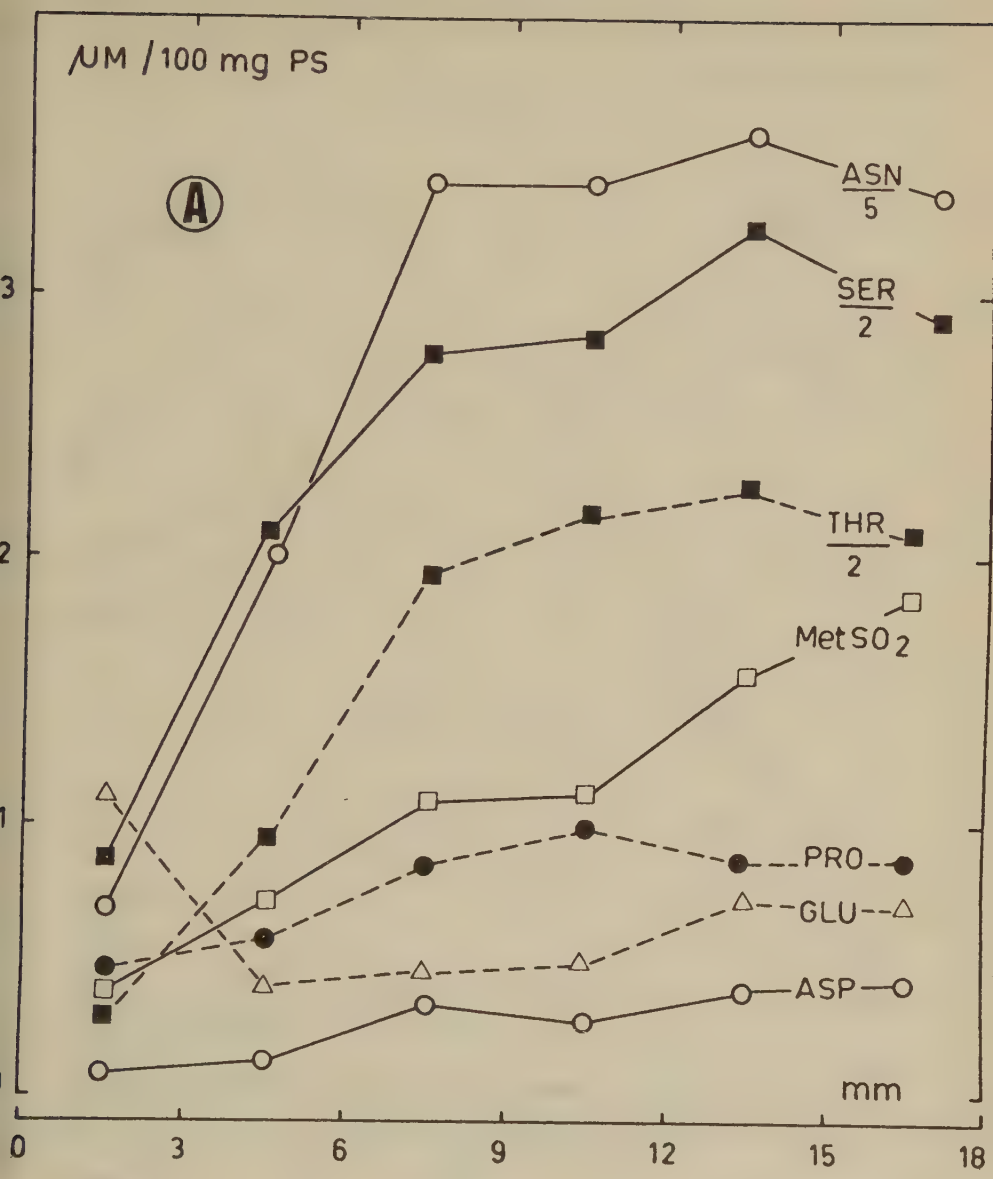


FIGURE 21

Distribution des acides aminés libres le long de l'axe des racines de Lentille (de 0 à 18 mm).

A : Fraction acide

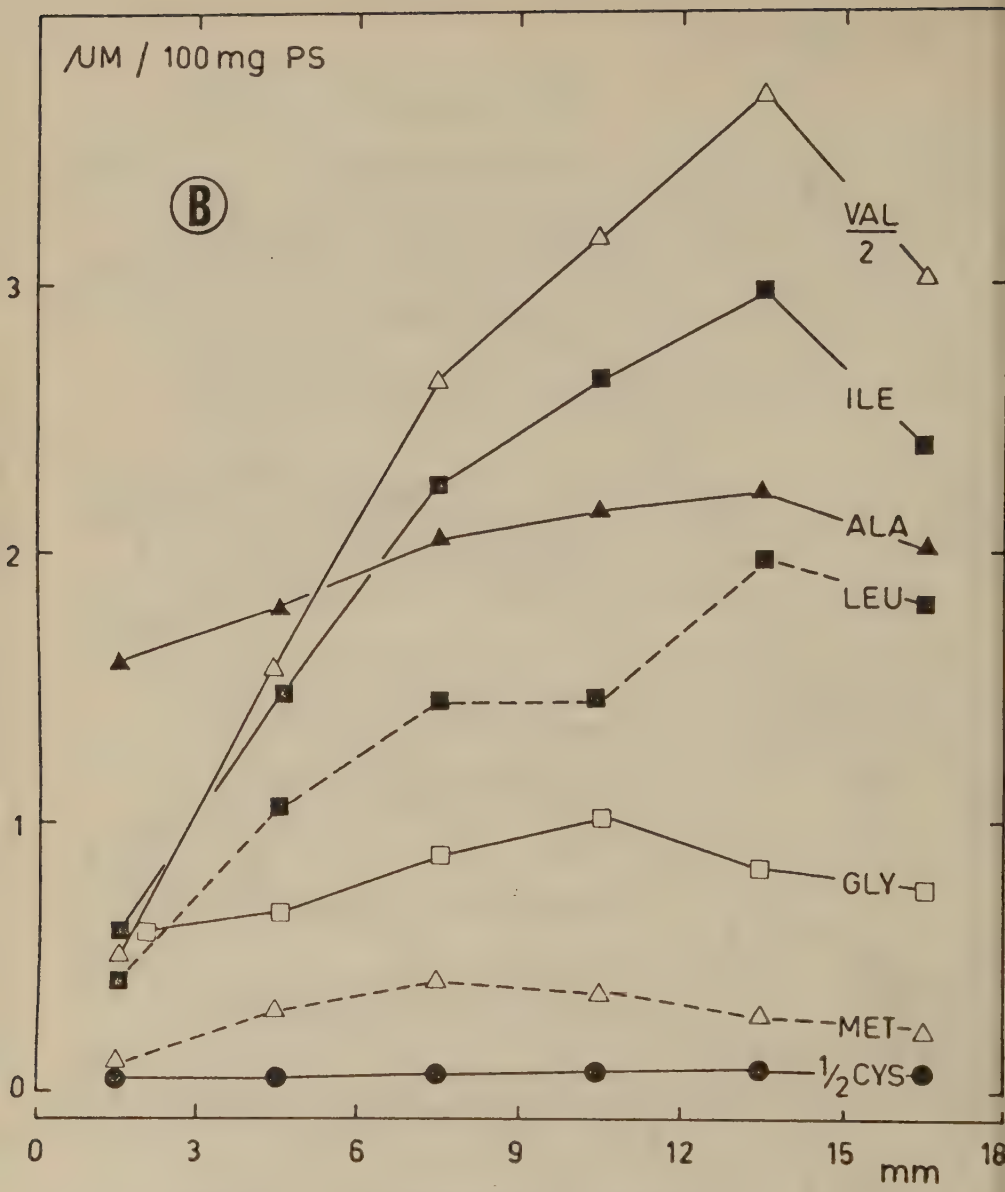


FIGURE 21 B : Fraction neutre (voir Fig 21 A)

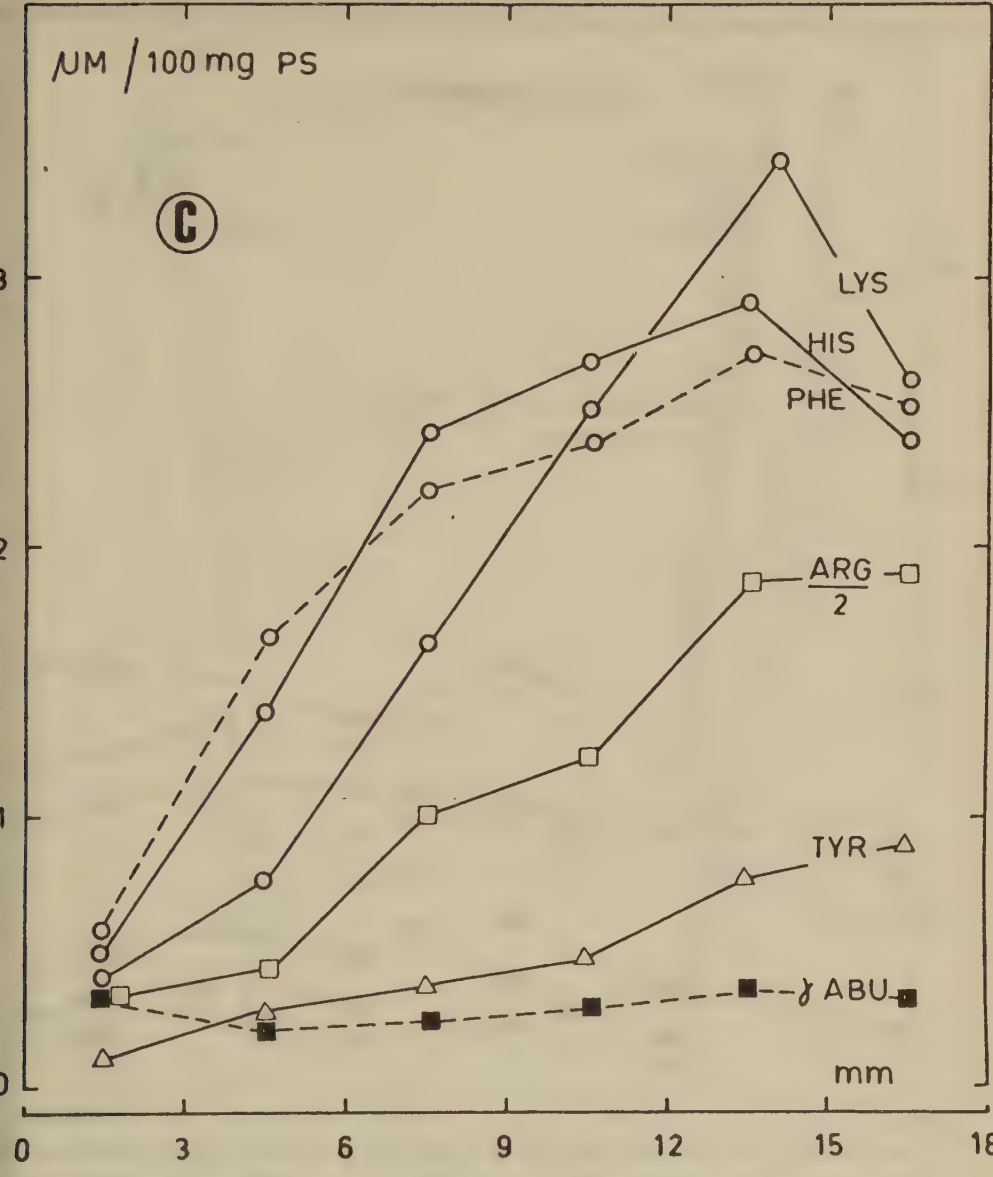


FIGURE 21 C : Fraction basique (voir Fig 21 A)

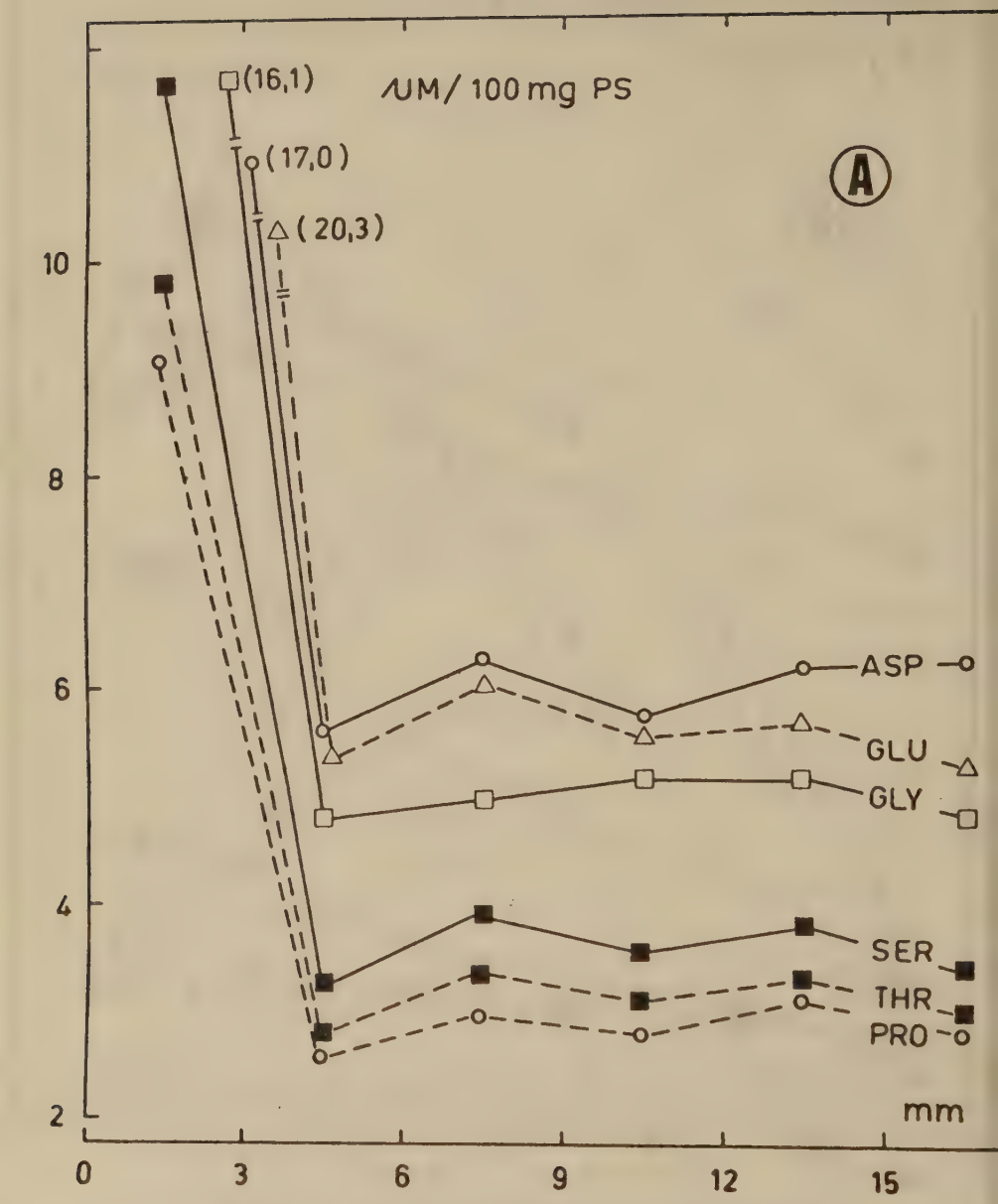


FIGURE 22

Distribution des acides aminés protéiniques le long de l'axe des racines de Lentille (de 0 à 18 mm).

A : Fraction acide

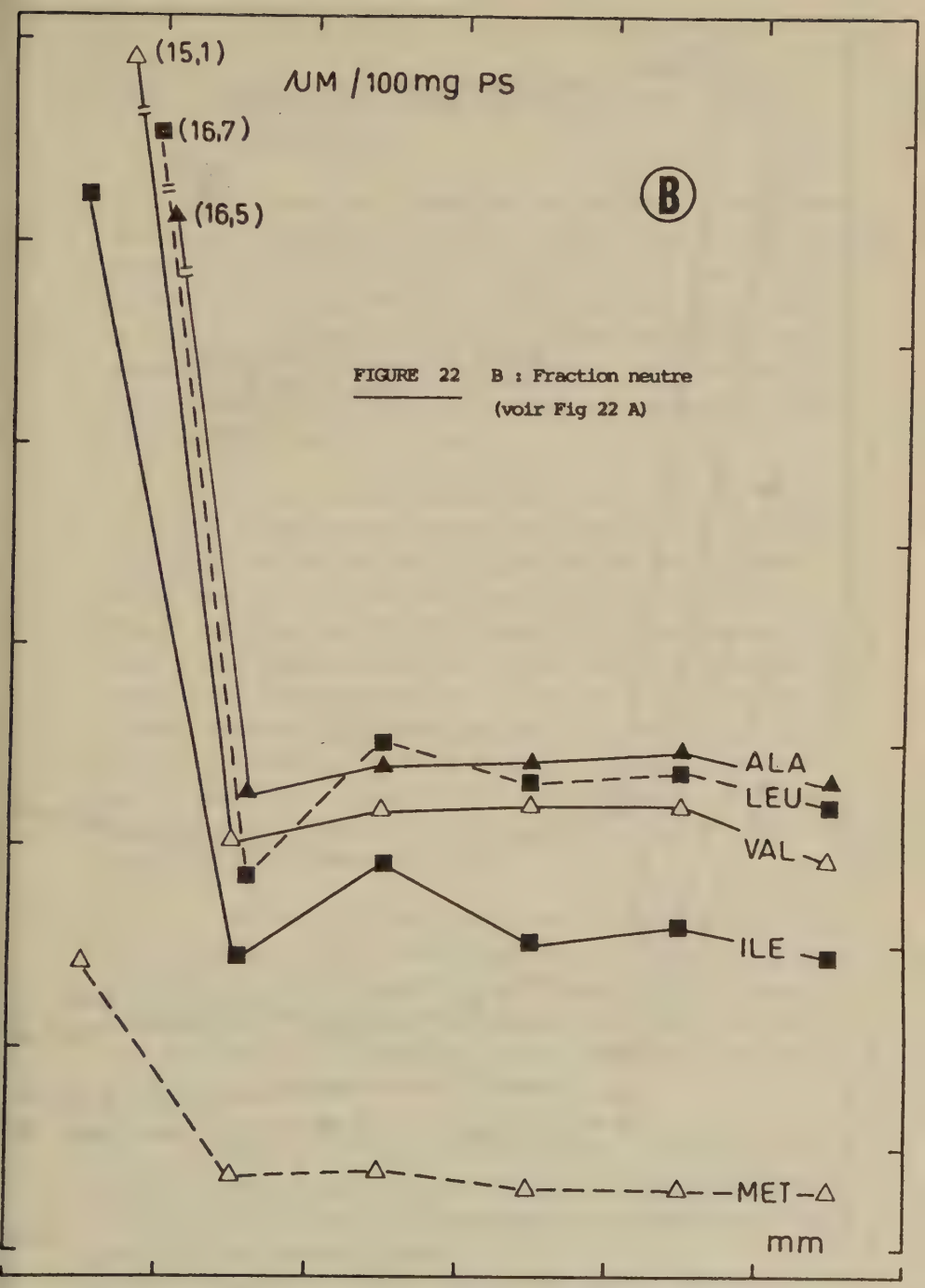


FIGURE 22 B : Fraction neutre
(voir Fig 22 A)

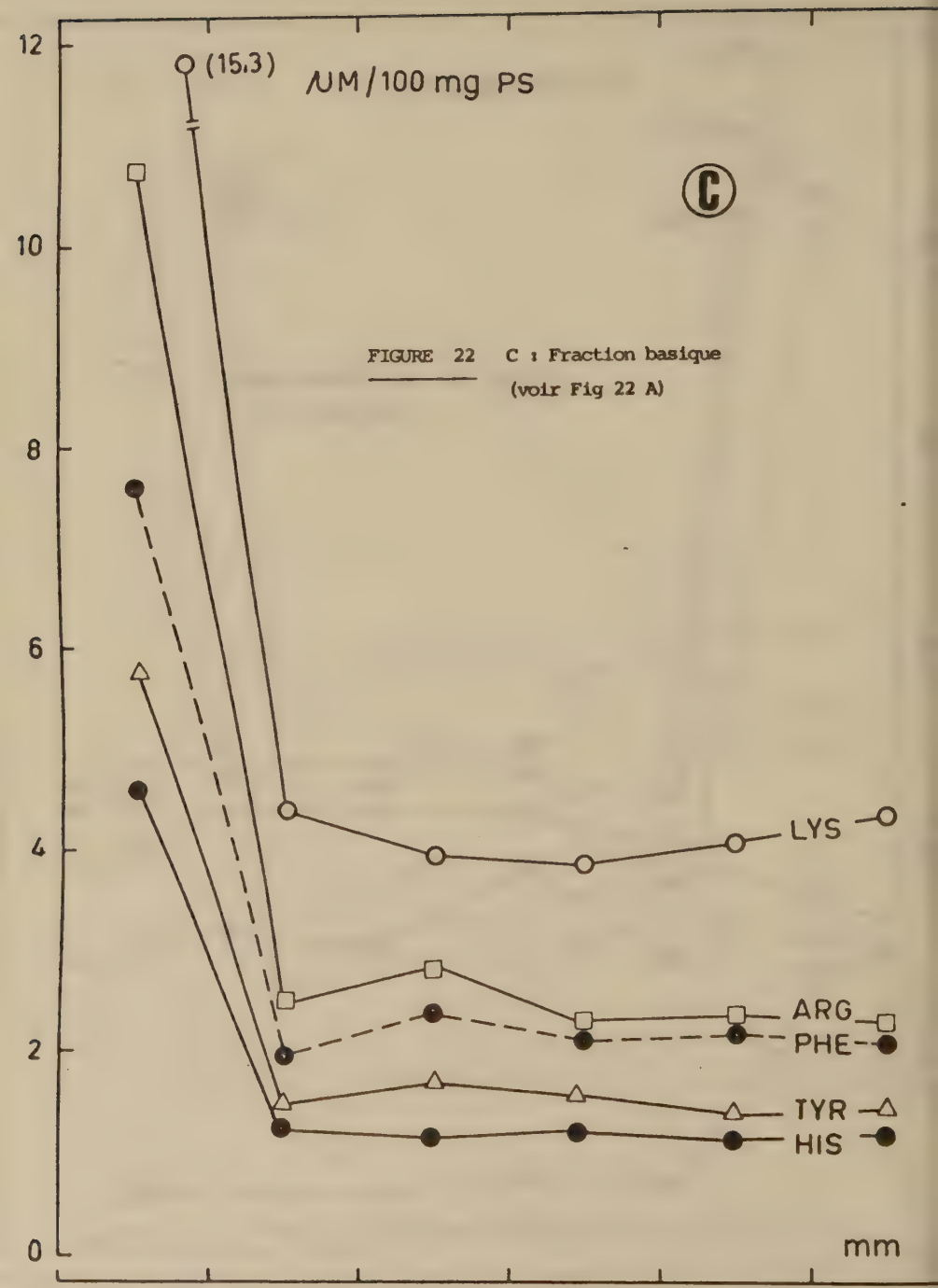


FIGURE 22 C : Fraction basique
(voir Fig 22 A)

2.3.4. Bilans d'azote et comparaison avec un extrait à l'acide trichloracétique

Tout comme pour le sous-chapitre précédent, nous avons comparé les valeurs en azote total de l'extrait, respectivement du culot éthanolique, à celles obtenus par calcul à partir des AA. De plus, il a été possible cette fois-ci d'établir une comparaison entre nos résultats et ceux obtenus sur du matériel similaire par SIEGENTHALER (1963) après une extraction à l'acide trichloracétique à 10%. Ces bilans ont été portés graphiquement dans la figure 23 pour l'azote soluble et dans la figure 24 pour l'azote non soluble.

Concernant l'azote soluble, nous savions (chap. II.6.5.) que la solution d'acide trichloracétique extrait une quantité plus grande d'azote que l'éthanol, solvant plus spécifique pour les AA libres. Surtout dans les trois premières zones de la racine, la solution d'acide trichloracétique extrait des quantités d'azote non aminé beaucoup plus importantes que dans les zones suivantes, où le décalage, devenu faible, reste parallèle entre les valeurs des deux extraits. L'azote α-aminé soluble - calculé à partir des concentrations en AA libres - représente environ 36% de l'azote soluble dans l'apex, 48% dans la deuxième zone et environ 58% dans les autres zones. En moyenne, on atteint donc les mêmes proportions que dans les racines entières (Tab. XXIII).

Concernant la figure 24, il y a moins d'azote précipitable par la solution d'acide trichloracétique que par l'éthanol. Ceci confirme encore nos résultats antérieurs,et nous rappelons à ce propos que la solution d'acide trichloracétique est considérée comme étant plus spécifique pour la précipitation des protéines. Cette différence se manifeste surtout pour la région apicale.

L'azote α-aminé non soluble à l'éthanol, calculé à partir des concentrations en AA hydrolysés du culot, contribue pour environ 62% à l'azote non soluble total. Cette proportion reste relativement inchangée pour toutes les zones de la racine.

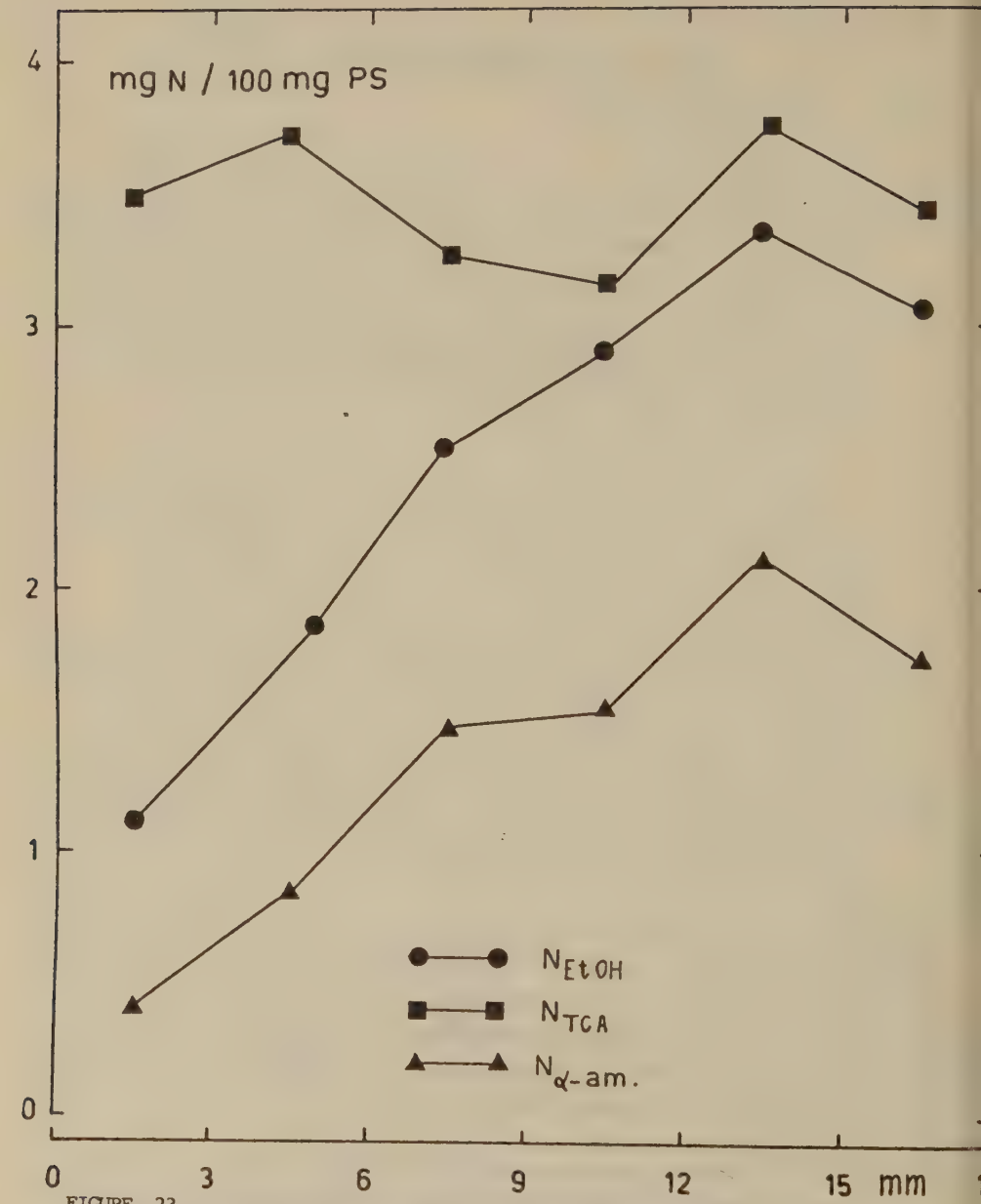


FIGURE 23

Quelques gradients d'azote soluble le long de l'axe des racines de Lentille (de 0 à 18 mm).

N_{EtOH}, azote soluble à l'éthanol 70%

N_{TCA}, azote soluble à l'acide trichloracétique 10%

$N_{\alpha\text{-am}}$, azote α-aminé soluble à l'éthanol 70%

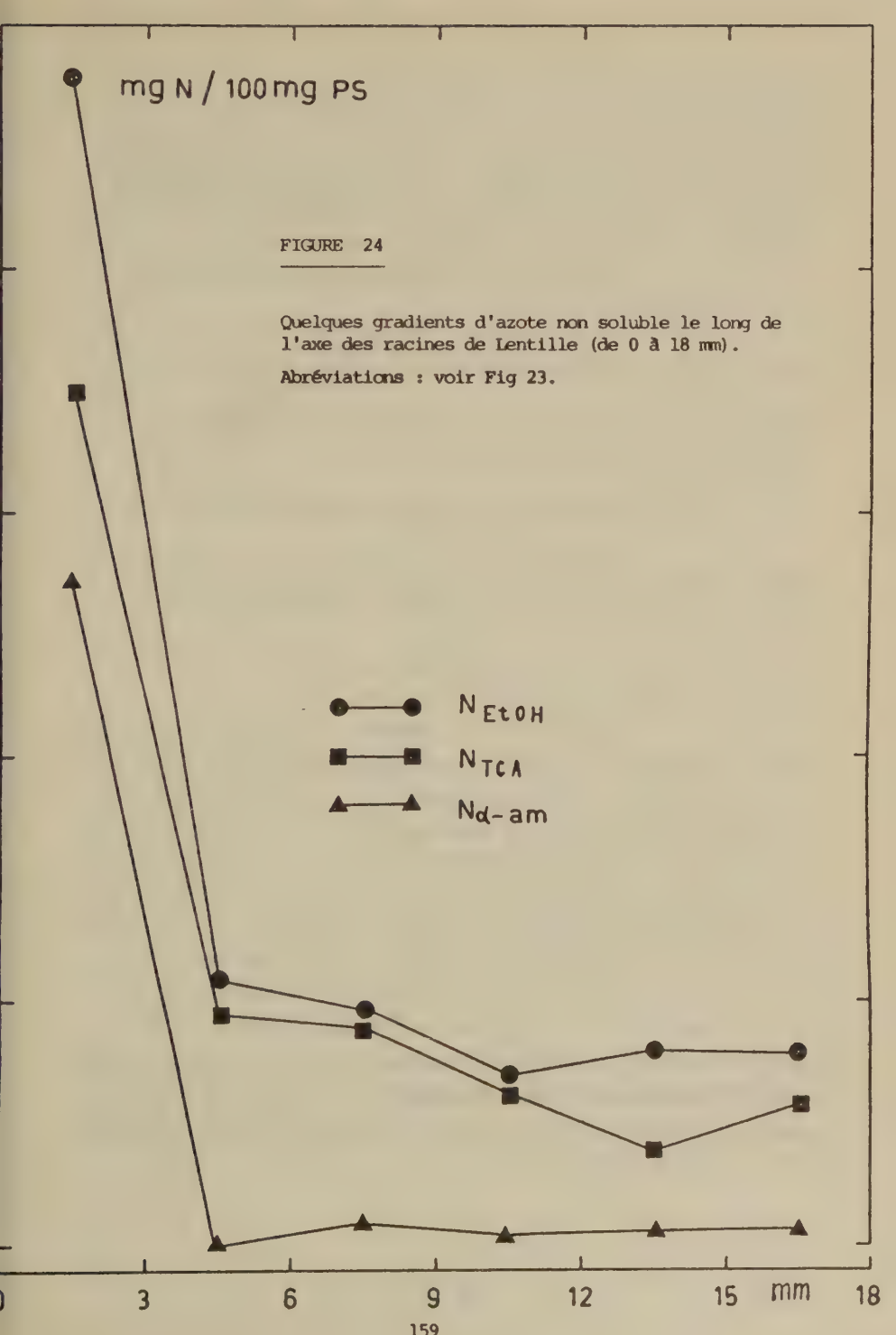


FIGURE 24

Quelques gradients d'azote non soluble le long de l'axe des racines de Lentille (de 0 à 18 mm).

Abréviations : voir Fig 23.

2.4. Discussion

Lors de cette discussion, nous retiendrons les aspects suivants de nos résultats en rapport avec la littérature existante :

a) la comparaison de nos gradients azotés avec d'autres gradients biochimiques;

b) l'importance de la zone apicale;

c) la signification de la solubilité différente de l'azote dans les premières zones;

d) un essai d'interprétation du gradient de certains AA;

e) le parallélisme des gradients et des concentrations dans les racines entières en fonction de la longueur.

Revoyons les points ci-dessus en détail :

a) Une grande partie des gradients biochimiques et physiologiques établis dans notre laboratoire sur les racines de Lentille (voir nos citations au no. 21.) se distinguent par une valeur maximale dans l'apex. Le nombre de cellules et de mitoses y est le plus élevé, tout comme la forte absorption d'oxygène et l'importance des sucres réducteurs, témoins d'une grande activité métabolique. Le quotient respiratoire supérieur à un révèle l'intensité respiratoire. De plus, cette zone à caractère méristématique se distingue par un nombre élevé de ribosomes et par une forte teneur en RNA (PILET et NOUGAREDE 1965); PILET et BRAUN 1970; PILET 1972 a), témoins d'une grande activité de la protéosynthèse. N'oublions cependant pas qu'à côté de cette dernière, la protéolyse est déjà fonctionnelle; mais dans le matériel jeune, la synthèse l'emporte nettement (SIEGENTHALER 1963; STEWARD et DURZAN 1965).

b) Les valeurs élevées de nos AA complètent l'image de cette zone, tout comme les teneurs très faibles des AA libres. Dans ce matériel jeune et très dense (poids sec total et poids du culot éthanolique élevés), la possibilité de former un pool d'AA libres inactifs est en effet assez restreinte. Il semble en résulter que dans les premières zones, la durée de vie de ces derniers soit extrêmement courte et qu'ils soient vite engagés dans les diverses voies métaboliques.

Pourtant la zone de 0 à 3 mm est très hétérogène, car PILET et NOUGAREDE (1965 et 1967) et PILET (1972 c) la caractérisent de la façon suivante :

- 0 à 0,20 mm : hauteur axiale de la coiffe qui remonte jusqu'à environ 0,25 mm à la périphérie;
- à 0,25 mm : le centre quiescent qui occupe la partie centrale;
- 0,25 à 0,70 mm : le début du cortex et du cylindre central constitués surtout des cellules méristématiques,
- 0,70 à 1,00 mm : zone des débuts d'élongation et de vacuolisation des cellules corticales;
- 1,00 à 3,00 mm : zone où les cellules corticales sont déjà très vacuolisées et où leur longueur atteint 4 à 5 fois la valeur initiale. Dans le cylindre central, les cellules se différencient. A partir de cette distance, les tissus n'évoluent plus avec la même rapidité et ils deviennent de ce fait assez hétérogènes.

Nos mesures dans le segment 0-3 mm intègrent donc toute une zone complexe. Sur du matériel similaire, SIEGENTHALER (1963) a subdivisé cette zone en deux parties pour les mesures d'azote : de 0 à 0,5 mm où la concentration de l'azote protéinique est la plus élevée et celle de 0,5 à 3,0 mm où la

concentration diminue de 20%. Les fortes concentrations de protéines seraient donc limitées aux cellules de la coiffe, au centre quiescent et à celles du méristème. Sur d'autres racines, ROBINSON et BROWN (1952) ainsi que JENSEN (1955) ont déterminé les protéines et certaines enzymes dans des segments encore plus fins (gradients de 1,0, respectivement 0,2 mm). La coiffe et le centre quiescent se révèlent alors pauvres en protéines. Pour JENSEN (1955), la région méristématique marque le début de la concentration des protéines par rapport au nombre de cellules, alors que pour les premiers auteurs, cette augmentation n'a lieu que dans la zone où les cellules s'allongent déjà.

Ces répartitions légèrement différentes des protéines peuvent dépendre et des difficultés techniques de segmentation et du matériel étudié pour lequel les attributions de "région méristématique" ou de "zone d'allongement" peuvent légèrement varier. Pour nous, ces résultats constituent une indication selon laquelle les teneurs élevées en AA protéiniques de la première zone résultent fort probablement des seules cellules méristématiques.

c) L'effet de la solubilité différente de l'azote par rapport aux deux solvants comparés se manifeste surtout pour les trois premières zones de la racine. Notamment la première contient trois fois plus d'azote soluble à l'acide trichloracétique et on peut se demander quels sont les composés responsables de la différence. Nous avons précédemment vu que BHATTY et FINLAYSON (1973) ainsi que SAIFER (1971) trouvent une plus grande solubilité des composés aminés basiques, riches en azote, dans la solution d'acide trichloracétique. Dans une moindre mesure, ces résultats ont été confirmés par nos essais comparatifs du tableau XVIII. Il n'est pas exclu que les bases puriques et pyrimidiques, également riches en azote, aient les mêmes propriétés. De plus, nous savons que l'acide trichloracétique peut maintenir en solution quelques protéines et également des complexes protéino-polysaccharidiques (BELL 1963).

d) Contrairement aux concentrations de tous les autres AA libres, l'acide glutamique (et l'acide γ-aminobutyrique) est la plus concentrée dans la première zone. Nous rappelons ici notre discussion du no. 1.3. où nous avons soupçonné le rôle important de cet acide aminé en rapport avec le cycle citrique. Devant l'activité métabolique intense dans cette zone, il n'est pas exclu qu'une grande partie de l'acide glutamique libre mesuré ne provient pas des cotylédons, mais d'une formation de novo dans la racine. OAKS (1966) qui administre du ^{14}C-acétate à des pointes de racines de Mais, trouve une absorption préférentielle du traceur dans les acides glutamique et aspartique. Nous citons la voie de formation classique à partir de l'alfa-oxoglutarate (FOWDEN 1967; MAHLER et CORDES 1971),

- soit par incorporation de l'ion NH_4^+ :

$$\underset{(NADPH)}{NADH} + \alpha\text{-oxoglutarate} + NH_4^+ \rightleftharpoons \underset{(NADP^+)}{NAD^+} + \text{L-glutamate} - H_2O$$

- soit par une réaction de transamination :

$$\text{Acide aminé} + \alpha\text{-oxoglutarate} \underset{PP}{\rightleftharpoons} \text{Acide cétonique} + \text{L-glutamate}$$

Une autre voie, vue dans le sous-chapitre précédent, est celle de la transformation de l'arginine en ornithine et en acide glutamique. SIMS et FOLKES (1964) soulignent ce rôle important de plaque tournante de l'acide glutamique pour les levures, où une grande partie de l'azote incorporé passe par le stade de l'acide glutamique avant de se retrouver dans les autres AA.

La teneur en acide aspartique par contre reste fort basse, même dans la première zone. Ceci est assez difficile à interpréter parce que les réactions de synthèse sont parallèle à celles de l'acide glutamique : amination du fumarate ou transamination de l'acide oxaloacétate.

Il existe la possibilité de l'amidation en asparagine, avancée par STEWARD et DURZAN (1965) ainsi que par FOWDEN (1973), quoique cette réaction ne soit pas encore bien expliquée. CHRISTIANSEN (1950) et PATE (1962) d'autre part constatent que l'acide aspartique est préférentiellement exsudé par des organes excisés.

La glycine, dont on a déjà évoqué la présence stimulante dans les milieux de culture (no.1.3.), est également présente en des concentrations basses qui pourraient être le résultat d'une métabolisation rapide.

La concentration relativement élevée de l'alanine semble résulter en grande partie d'une synthèse dans la racine (OAKS 1966). Elle se forme par une réaction de transamination à partir du pyruvate :

$$\text{Pyruvate} + \text{Acide aminé} \overset{PP}{\rightleftharpoons} \text{L-alanine} + \text{Acide cétonique}$$

Concernant la proline, il est intéressant d'établir un parallèle avec l'hydroxyproline protéinique dont la proline libre est le précurseur (CLELAND 1968; CHRISPEELS 1969; LAMPORT 1970; MAHLER et CORDES 1971). La concentration de l'hydroxyproline protéinique est en général inversément proportionnelle à l'intensité de croissance (CLELAND et KARLNES 1967; CHRISPEELS 1969; JOTTERAND-DOLIVO et PILET 1975). Or, nos résultats des figures 19 et 21 semblent indiquer une proportionalité directe entre la teneur en proline libre et la croissance. On peut donc supposer qu'une croissance active freine l'incorporation de la proline libre dans les protéines et son hydroxylation en hydroxyproline. Le travail de STEWARD et BIDWELL (1958) supporte cette hypothèse en ce sens que le degré d'incorporation de la proline libre (et de l'hydroxyproline libre, dont la teneur est cependant négligeable) est une mesure possible de l'accroissement des protéines totales et ainsi de la vitesse de croissance. Dans cette optique, il sera intéressant de suivre les teneurs en proline libre lors des chapitres suivants qui traitent de croissance inhibée.

e) Il reste à relever le remarquable parallélisme entre les gradients et les concentrations des acides aminés en fonction de la longueur des racines (Fig 21-22 et 19-20). Une similitude du même type avait été observée par PILET et SIEGENTHALER (1962) en ce qui concerne les activités des auxines-oxydases et les vitesses de croissance des racines.

Avec ces auteurs, on peut suggérer qu'une petite racine, où les phénomènes de division l'emportent sur ceux de l'élongation, puisse être comparée à la zone méristématique d'une racine entière plus longue. Pareillement les évolutions des AA confirment que : "la succession topographique des principales zones le long d'un axe radiculaire (zones de division, d'élongation et de différentiation) est la récapitulation des différents stades de croissance de la racine".

3. VIEILLISSEMENT DES RACINES DE 18 MM

3.1. Introduction

Le problème physiologique du vieillissement et de la sénescence qui intéresse toutes les spécialités de la biologie a surtout été étudié en relation avec la physiologie végétale. Si la sénescence désigne une évolution naturelle, irréversible dans le temps, qui se passe in vivo et qui "...permet à l'espèce de s'adapter aux conditions d'environnement telles que les variations saisonnières..." (LEOPOLD 1961); on parle de vieillissement lorsque le phénomène a été provoqué par l'expérimentateur, notamment lors des études sur les organes ou les parties d'organes excisés (PILET 1957 a-b et 1969; VARNER et coll. 1963; WAREING et SETH 1967; WOOLHOUSE 1967).

Pourtant, dans le cas d'expériences sur des feuilles excisées, destinées à connaître une abscission naturelle, les deux notions se rapprochent...et il se fait que beaucoup de changements biochimiques sont similaires pour les deux phénomènes dont le parallélisme apparaîtra tout au long de ce chapitre. Le jaunissement des feuilles suivi de la chute constitue un exemple spectaculaire de la sénescence d'un organe sur lequel la majorité des travaux ont porté. Sénescence simultanée des feuilles (en automne) qui est causée par des facteurs exogènes tels que l'abaissement de la température, le raccourcissement des journées, la maturation des fruits ainsi que par des inhibiteurs endogènes tel que l'acide abscissique. Sénescence séquentielle par dominance apicale, où les feuilles les plus âgées disparaissent devant la poussée des feuilles nouvelles (OSBORNE 1962; WAREING et SETH 1967).

Après l'excision, divers phénomènes peuvent se manifester selon le traitement ultérieur. Dans les feuilles excisées, non nourries, la dégradation des protéines et de la chlorophylle survient en général plus tôt que dans celles qui restent attachées. D'autres feuilles excisées dont le pétiole est placé dans une solution nutritive, peuvent former des racines et rester en vie plus longtemps que les premières. Aux cellules des explantats enfin est conféré une durée de vie quasi illimitée (BROWN 1965; SIMON 1967; WOLLGIEHN 1967).

Les travaux concernant les AA et les protéines des feuilles sénescentes ou vieillissantes sont unanimes : après l'abscission ou l'excision, la feuille est l'objet d'une forte protéolyse avec une augmentation simultanée de la teneur en AA libres (CHIBNALL 1951; VICKEREY 1956; MAC KEE 1958; THOMPSON et STEWARD 1966; CARR et PATE 1967; KAWASHIMA et coll. 1967; KNYPL 1967, SIMON 1967; WOLLGIEHN 1967; WOOLHOUSE 1967; MARTIN et THIMAN 1972 etc.). Rares sont les travaux sur le vieillissement d'autres organes. BEMILLER (1972) rapporte des résultats similaires pour les parenchymes d'épis de Mais, mais dans ceux des tiges il n'y a pas de variation significative des protéines. CHRISTIANSEN et THIMAN (1950) mesurent par contre une augmentation de la teneur en protéines et une diminution de celle des AA libres dans des segments de tige de Pois soumis à un vieillissement de 24 h dans une solution aqueuse. Dans cette dernière, les auteurs révèlent des quantités importantes d'azote perdu par exsudation. SACHER et coll. (1972) observent une synthèse de novo de nombreuses enzymes dans des disques de pomme de terre après 24 h de vieillissement; par l'inclusion de ^{14}C-leucine, la preuve est donnée que la protéosynthèse continue.

Dans les pointes de racines de Mais, OAKS (1966) observe (6h seulement après l'excision) une diminution de concentration de presque tous les AA. La plus importante est celle de la proline

libre dont la teneur initiale est réduite à 39%. Seuls les taux en glutamate et en γ-aminobutyrate libres ainsi que celui de l'aspartate protéinique augmentent.

Nos expériences sur les racines de Lentille consistent à étudier l'effet de différentes durées de vieillissement sur le taux en azote et en AA.

3.2. Conditions expérimentales

Après la culture de façon habituelle (chap. I.A.), les racines sélectionnées à 18 mm sont excisées et déposées dans une boîte de Pétri (obscurité, 25°C) sur une couche de coton couverte de papier filtre et imbibée d'une solution de tampon phosphate. Cette dernière est constituée à partir d'une solution de Na_4HPO_4 (M/15) à laquelle on ajoute une solution de KH_2PO_4 (M/15) jusqu'à obtention d'un pH de5,1, reconnu comme étant favorable à la croissance (PILET 1958). A la fin de l'expérience (1-2-3-4 jours), les racines sont prélevées, rincées à l'eau déionisée (conservée au bain de glace) et récoltées selon le procédé décrit au chapitre I.A.3. et 4..

3.3. Résultats

3.3.1. Le poids et l'azote

Sur le matériel vieillissant, nous avons déterminé le poids frais, le poids sec ainsi que l'azote soluble et non soluble (Tab XXV). Le poids frais et surtout le poids sec diminuent en fonction de la durée de sénescence.

TABLEAU XXV

Valeurs du poids frais, du poids sec, de l'azote soluble et non soluble, et du rapport de ces valeurs en relation avec la durée de vieillissement des racines

Durée du vieillissement (en jours)	0	1	2	3	4
PF (g/100 r)	1,84	1,67	1,60	1,54	1,51
PS (mg/100 r)	195,23	154,38	139,38	117,14	108,53
PF/PS (g/g)	9,42	10,38	11,48	13,15	13,91
mg Ns/100mg PS	2,48	2,47	2,32	2,22	1,86
mg Nns/100mg PS	1,95	2,05	2,16	2,18	2,31
mg Ntot/100mg PS	4,43	4,52	4,48	4,40	4,17
Ns/Nns	1,27	1,20	1,07	1,02	0,81
mg Ns/100 r	4,84	3,83	3,23	2,60	2,02
mg Nns/100 r	3,81	3,16	3,01	2,55	2,51
mg Ntot/100 r	8,65	6,99	6,24	5,15	4,53

PF : poids frais
PS : poids sec
Ns : azote soluble à l'éthanol 70%
Nns : azote non soluble à l'éthanol 70%
Ntot : somme de l'azote soluble et non soluble
r : racine

Parallèlement aux diminutions de poids, les teneurs en azote par 100 racines baissent régulièrement. Après quatre jours d'expérience, la teneur en azote total est réduite à environ la moitié de la valeur initiale. Les teneurs exprimées en fonction du poids sec donnent une diminution de l'azote soluble et une augmentation de l'azote non soluble. L'évolution au cours du vieillissement s'exprime clairement par le calcul du rapport de l'azote soluble au non soluble. Ce dernier, qui passe d'une valeur de 1,27 à 0,81 après quatre jours, montre la contribution décroissante de l'azote soluble.

Séparément, nous avons constaté un allongement des racines d'environ un mm après le premier jour. Après, la longueur ne varie plus, ce qui est en rapport avec le manque de substances nutritives dans le milieu de culture. Au quatrième jour, les racines sont légèrement ratatinées et elles commencent à brunir.

3.3.2. Les acides aminés libres

Les variations des principaux AA libres, exprimées par rapport à 100 racines, ont été portées dans les figures 25 A,B,C selon leur ordre d'élution de la colonne d'analyse chromatographique. La sérine et l'asparagine n'ont pas été retenues à cause des variations trop importantes des résultats. Ces derniers semblent pourtant indiquer pour l'asparagine des teneurs croissantes jusqu'à trois jours de vieillissement. Dans la discussion, où nous traiterons le phénomène de l'exsudation, nous aborderons une cause probable de ces fluctuations.

Les teneurs des autres AA libres diminuent régulièrement au fur et à mesure que la durée du vieillissement augmente. Seules

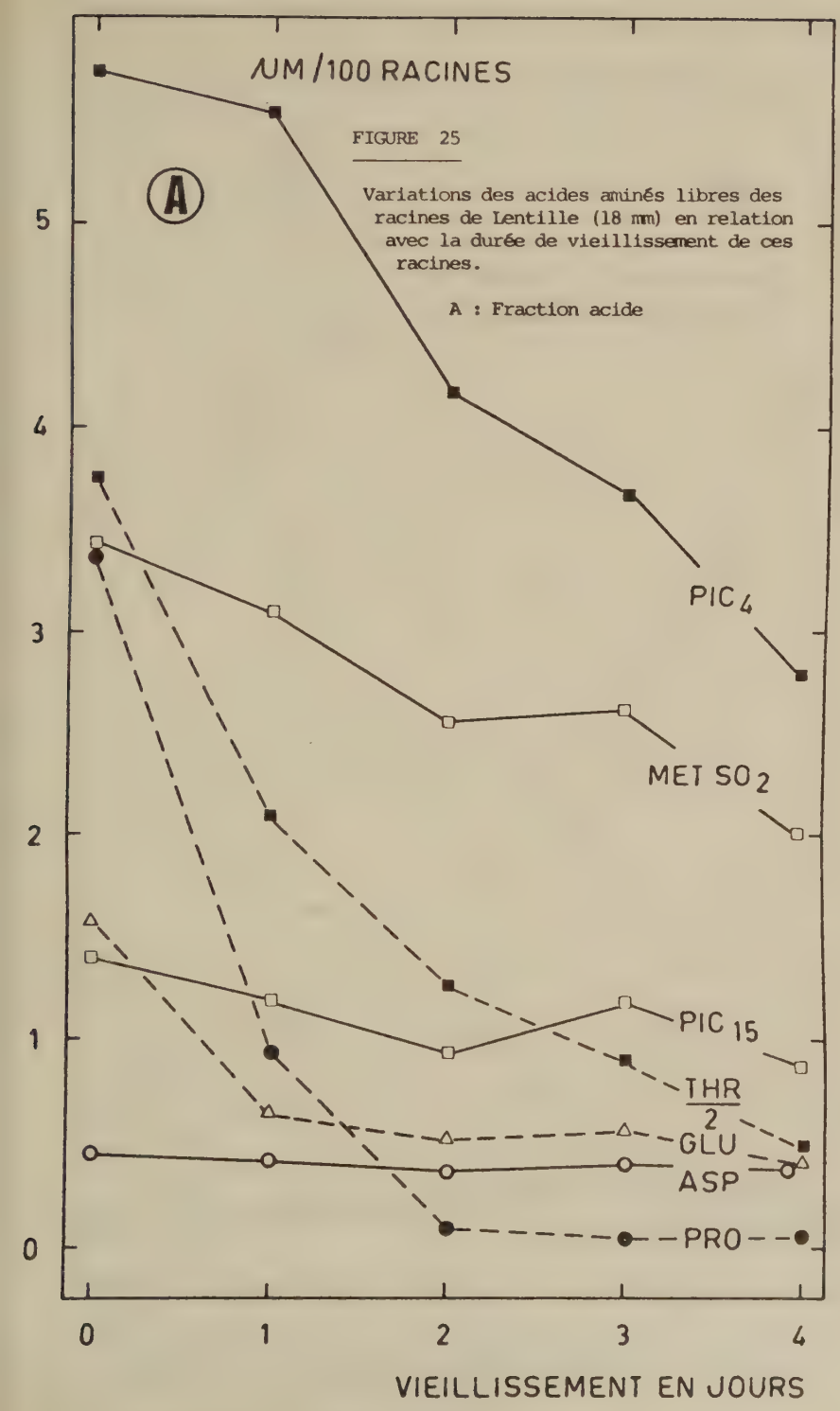


FIGURE 25

Variations des acides aminés libres des racines de Lentille (18 mm) en relation avec la durée de vieillissement de ces racines.

A : Fraction acide

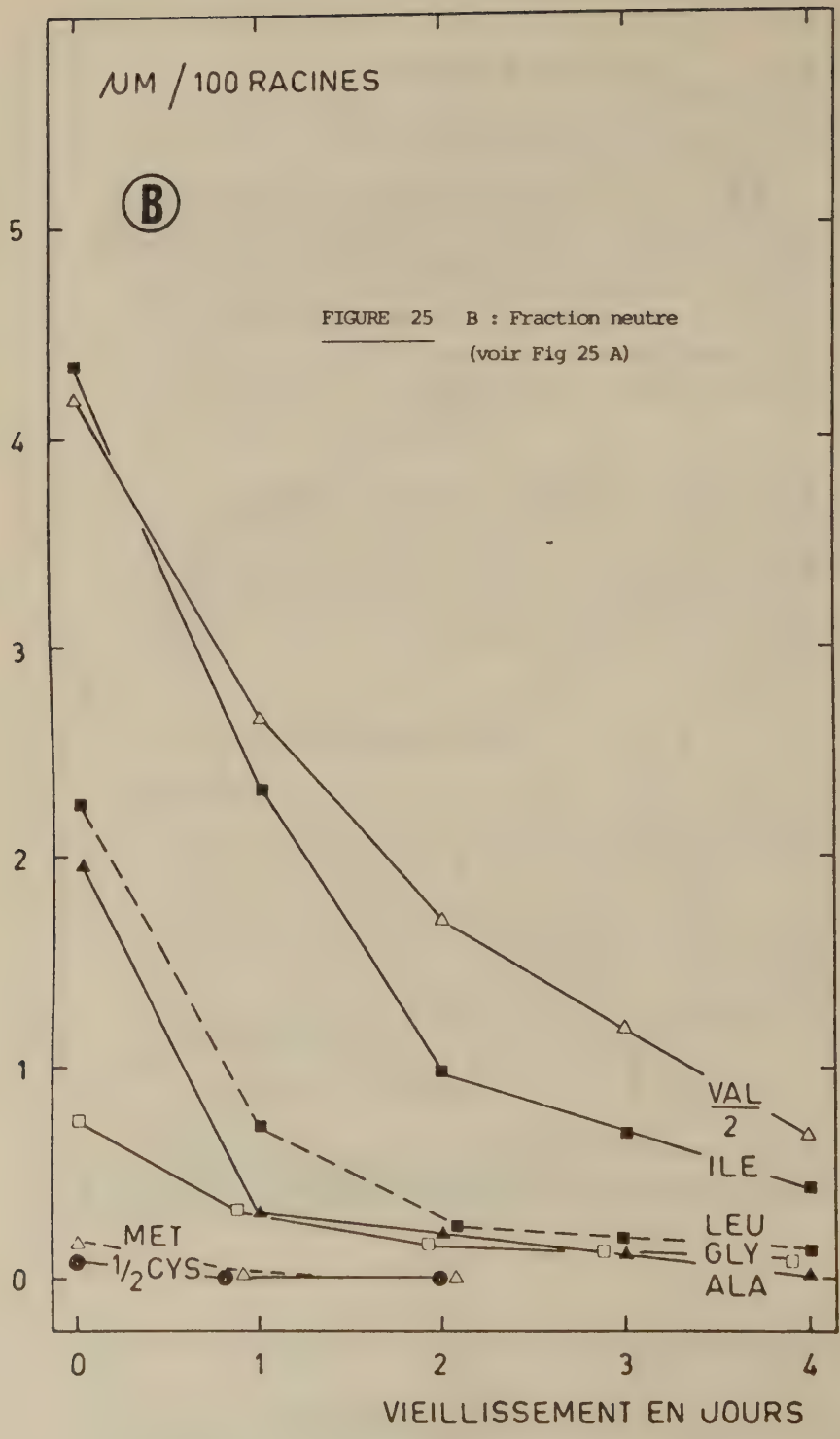


FIGURE 25 B : Fraction neutre
(voir Fig 25 A)

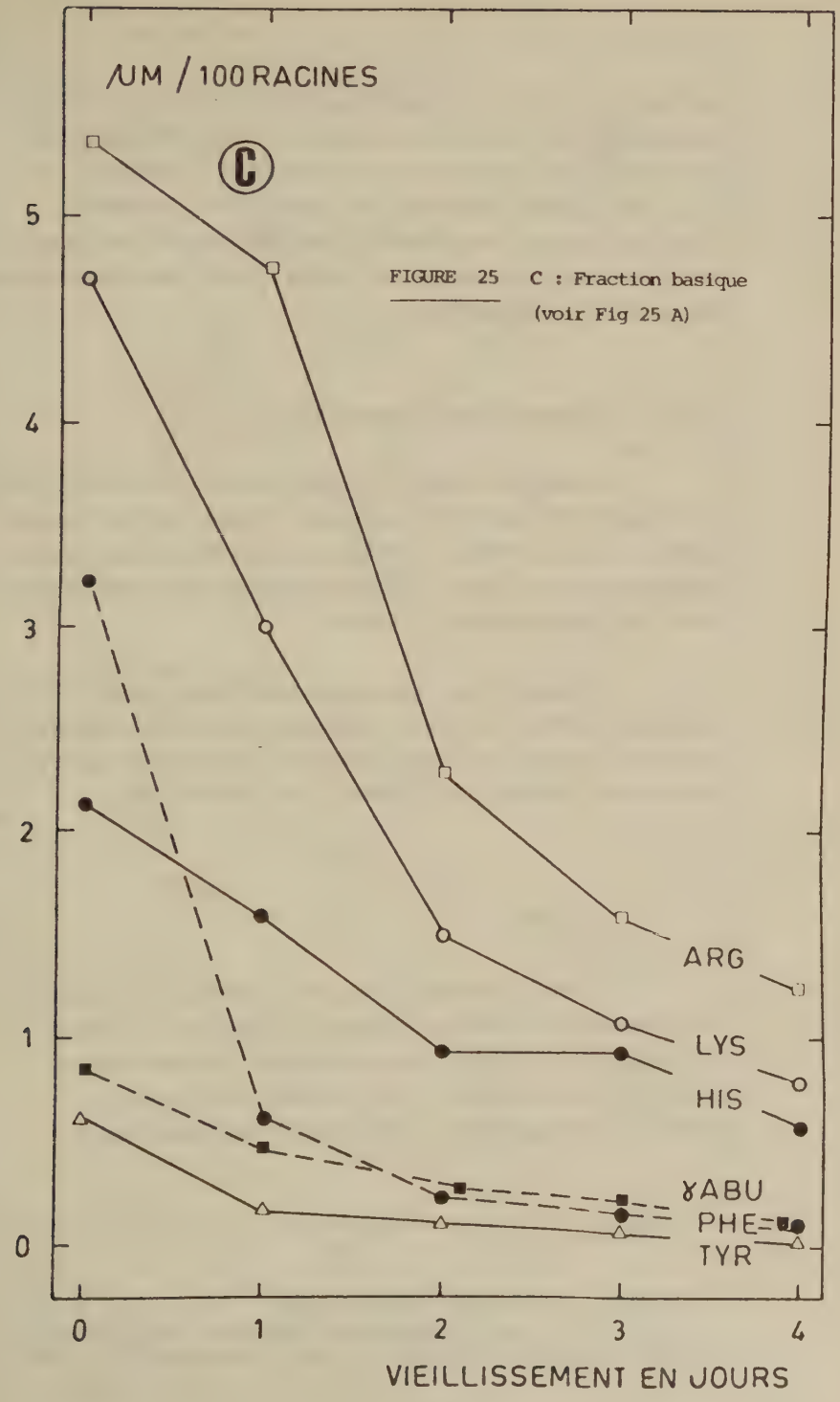


FIGURE 25 C : Fraction basique
(voir Fig 25 A)

les valeurs du peptide, représenté par le pic no.15 et de l'acide aspartique restent relativement constantes. Celle de l'acide glutamique est assez constante entre le premier et le dernier jour. Le pic de la proline disparaît très rapidement et le composé n'est pratiquement plus décelable après deux jours de vieillissement, tout comme la méthionine et la cystine dont les concentrations étaient déjà faibles au départ.

3.3.3. Les acides aminés protéiniques

Les diminutions des AA protéiniques sont moins régulières que celles des AA libres. Les variations, tracées dans les figures 26 A,B,C, se caractérisent en général par de fortes chutes de concentration après un jour, pour les AA basiques; après deux ou trois jours, pour les AA neutres ou acides.

La diminution de concentration de l'histidine et de la phénylalanine (dont les valeurs sont assez irrégulières) est moins apparente. Certains composés se distinguent par une augmentation de concentration entre le troisième et le quatrième jour.

3.4. Discussion

L'examen des figures ci-dessus a montré que les valeurs des AA protéiniques basiques diminuent le plus après un jour de vieillissement, alors que celles des autres AA baissent surtout un ou deux jours plus tard. Il est intéressant de tirer un parallèle avec nos résultats antérieurs et les conclusions de

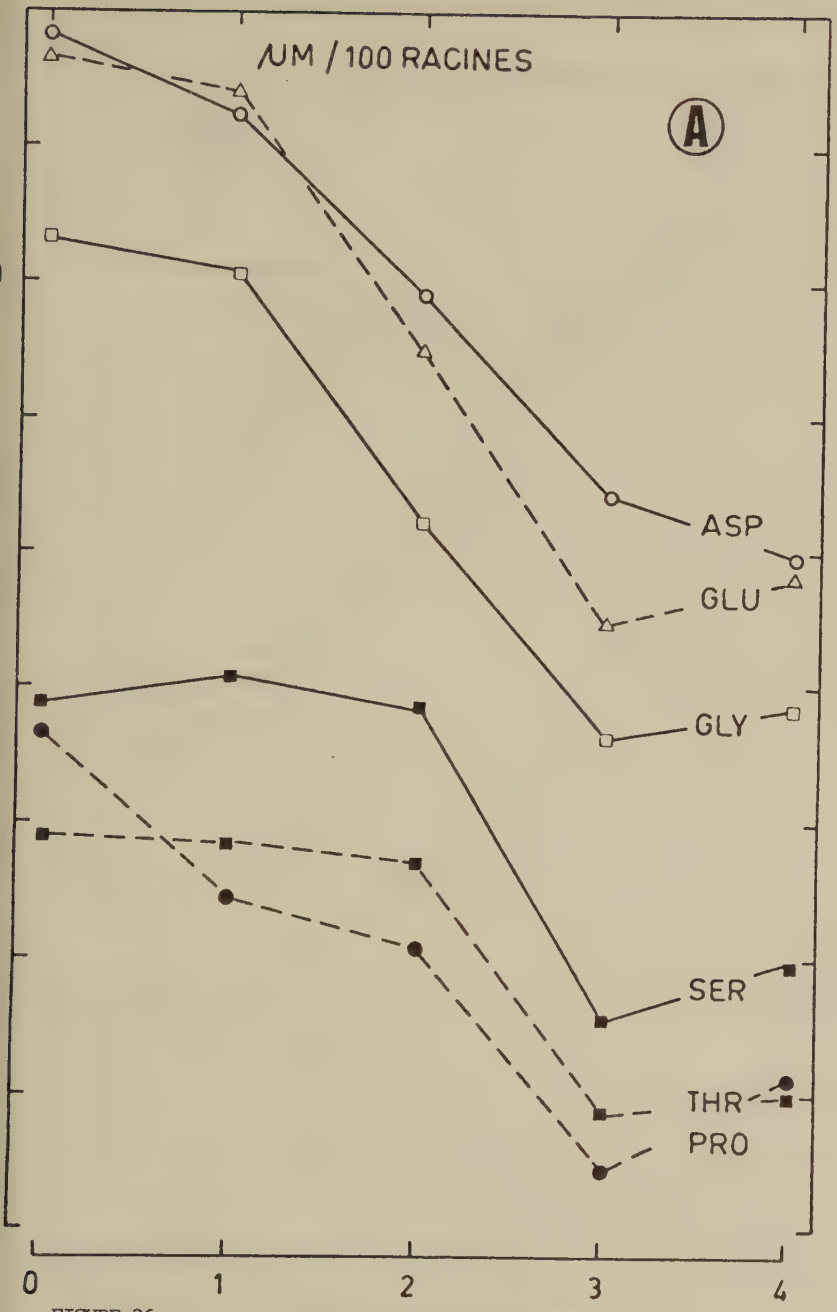


FIGURE 26

Variations des acides aminés protéiniques des racines de Lentille (18 mm) en relation avec la durée de vieillissement de ces racines.

A : Fraction acide

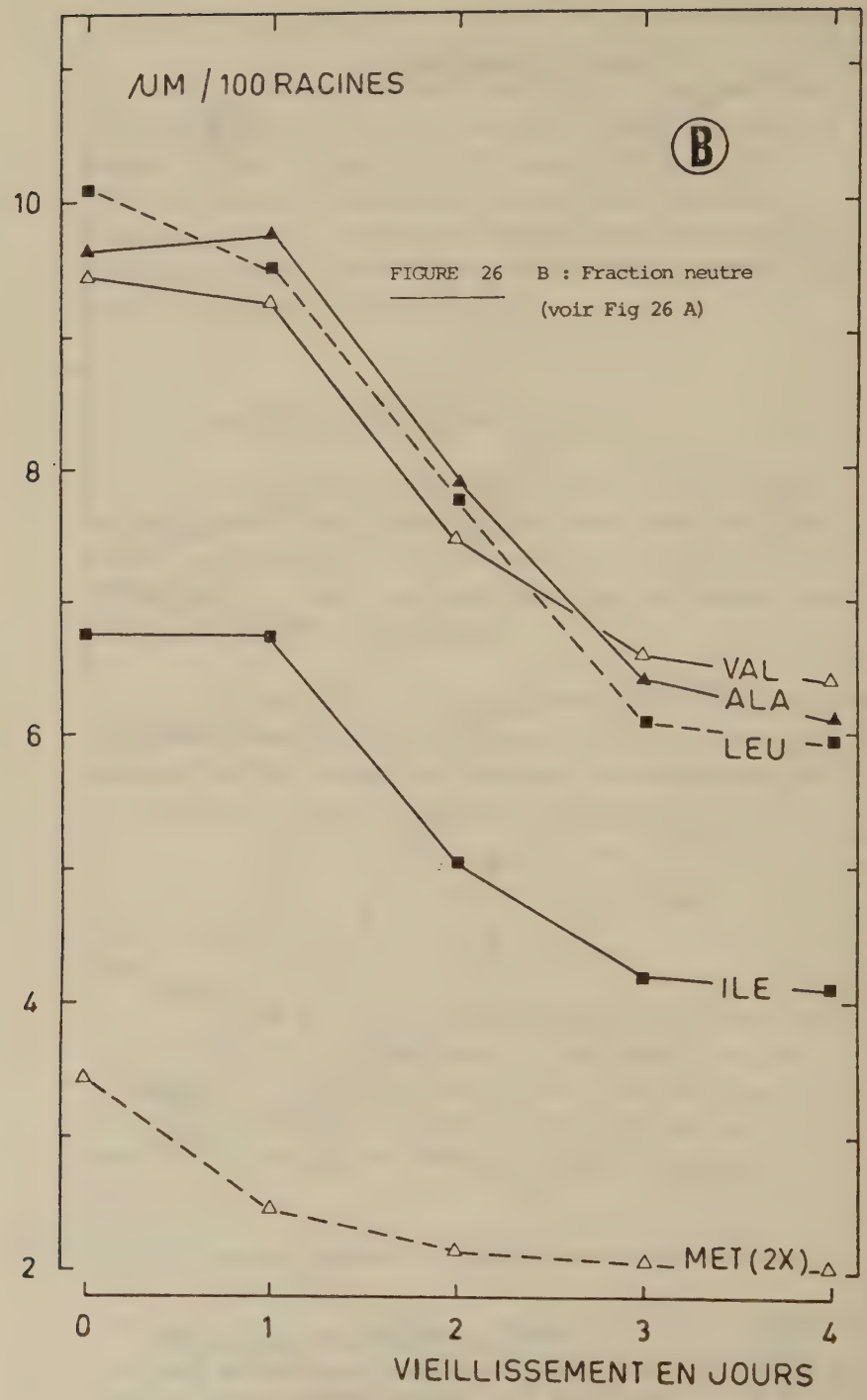


FIGURE 26 B : Fraction neutre
(voir Fig 26 A)

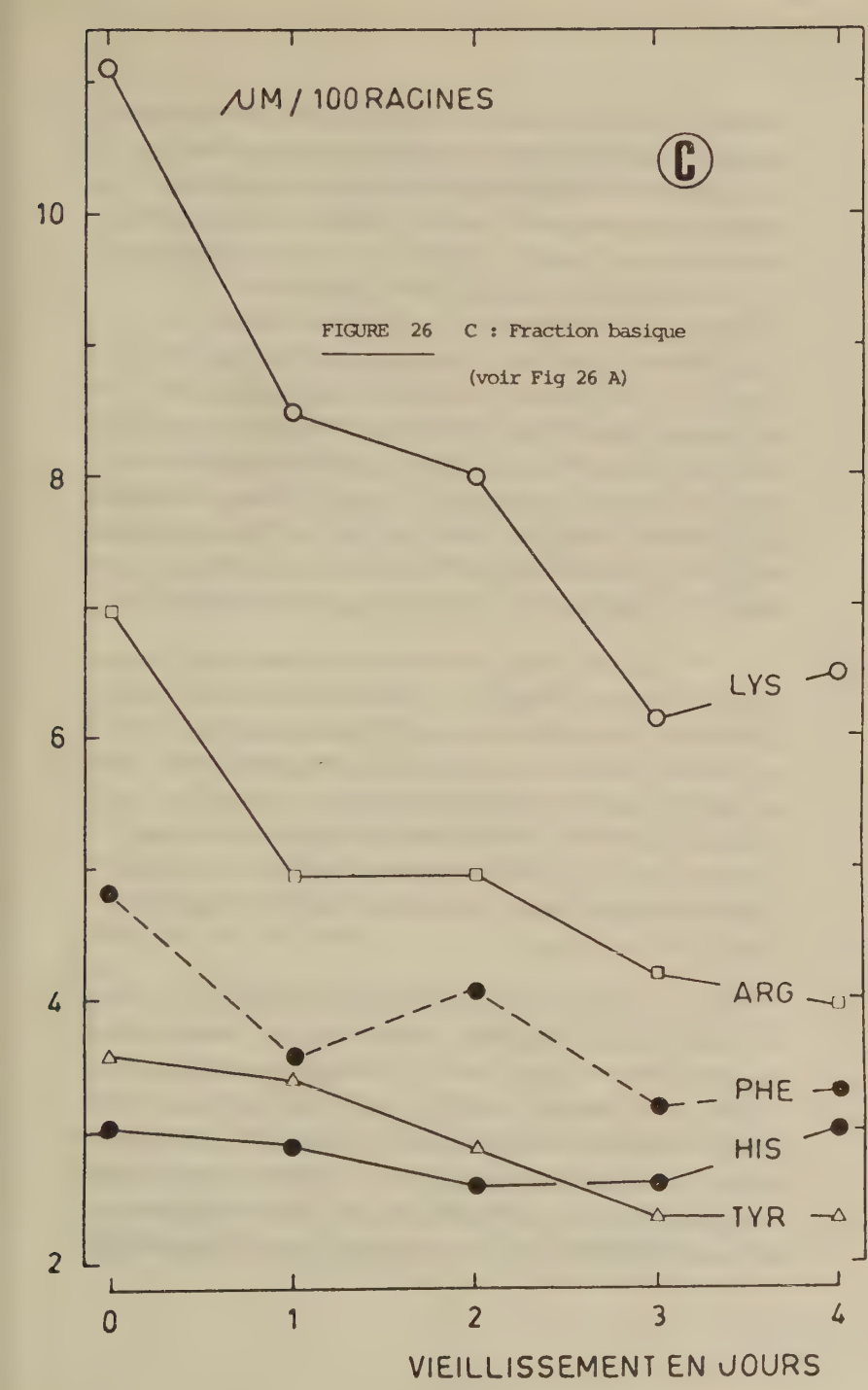


FIGURE 26 C : Fraction basique

(voir Fig 26 A)

OAKS (1966). Selon cet auteur, les pointes de racines de Mais (5 mm) ont surtout une capacité de synthèse d'AA acides (notamment des acides glutamique et aspartique), alors que celle de la plupart des AA neutres et basiques est déficiente. Ces derniers sont plutôt transportés depuis les cotylédons, ce qui ressortait déjà de nos discussions précédentes. Or, il n'est pas exclu que la diminution des teneurs après un jour d'excision soit causée par la suppression du flux nutritif en provenance des cotylédons, plutôt que par une perturbation des réactions métaboliques dans la racine. Une preuve serait donnée par le léger allongement qui est encore enregistré après un jour de vieillissement. Les changements métaboliques, où la protéolyse l'emporte de plus en plus sur la protéosynthèse (BROWN 1965, MARTIN et THIMAN 1972), surviennent de façon progressive en même temps que le vieillissement se prolonge.

La concentration fortement décroissante de la proline libre correspond aux valeurs de OAKS (1966), obtenues sur des pointes excisées de racines de Mais. Ces résultats permettent de confirmer les conclusions des chapitres précédents concernant la teneur en proline libre en rapport avec la vitesse de croissance de la racine. Tout comme la vitesse de croissance s'annule peu après l'excision, la valeur de la proline libre passe d'une concentration relativement importante à zéro, en l'espace de deux jours.

Finalement, ce sont les pertes régulières de poids sec, de l'azote total par unité de racines ainsi que la diminution du rapport de l'azote soluble sur l'azote non soluble qui méritent une attention spéciale. Divers auteurs ont en effet mis en évidence le phénomène d'exsudation de matériel azoté. Dans les racines, où il est très important, le phénomène a été décrit par PATE (1962) ainsi que par PAYNE et coll. (1965). L'exsudation est moins importante pour les segments de tige (CHRISTIANSEN et

THIMAN 1950; CHRISTIANSEN 1950) ou de feuille mis en flottement sur une solution aqueuse (KNYPL 1967). Pour vérification, nous avons mesuré jusqu'à 4 mg d'azote perdu dans la solution d'imbibition de la boîte de Pétri, après quatre jours de vieillissement pour 100 racines.

D'après les valeurs de l'azote total (Tab XXV), nos pertes dans les racines sont de l'ordre de 50% après quatre jours. OAKS (1966) trouve une diminution de 26% en AA libres de segments racinaires conservés pendant 6 h dans une solution saline. Pour des disques de feuille, la perte est d'environ 20% après quatre jours (KNYPL 1967), et pour des segments de tige on peut l'estimer à 3,3% après un jour (CHRISTIANSEN et THIMAN 1950). Dans un deuxième travail, CHRISTIANSEN (1950) montre le parallélisme entre la perte du poids sec et l'accroissement de l'exsudat.

Le même auteur montre que l'exsudat est constitué par environ 1/3 de sucres réducteurs, 1/3 d'AA libres, 1/4 d'asparagine, le reste étant réparti entre les acides organiques, les lipides et les ions minéraux. L'asparagine est donc le composé le plus concentré de l'exsudat : elle seule peut représenter la moitié de l'azote soluble. Nos conditions de vieillissement qui ne contrôlent pas spécialement la possibilité d'exsudation, pourraient donc causer les variations importantes de concentration que nous rencontrons pour cet amide.

Selon les auteurs ci-dessus, pratiquement tous les AA et même quelques peptides peuvent être présents dans l'exsudat. Il est cependant intéressant de relever que la proportion de certains AA de l'exsudat n'est pas identique à celle de l'organe excisé. Ainsi, CHRISTIANSEN (1950) note la présence dans l'exsudat d'environ quatre fois plus d'acide aspartique et d'environ quatre fois moins d'arginine. Sans comparer avec les AA du végétal, PATE (1962) ainsi que PAYNE et coll. (1965) confirment des valeurs

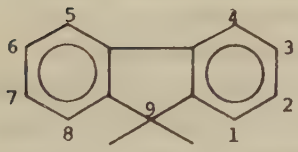
élevées d'acide aspartique et des valeurs faibles ou nulles d'arginine dans les exsudats de racines.

Est-ce que cette facilité d'exsudation de l'acide aspartique libre peut être mise en rapport avec les concentrations faibles et constantes de cet AA au cours de nos expériences de vieillissement ? On peut en effet imaginer que nos extraits racinaires représentent surtout le pool stable de l'acide aspartique. Ce pool est petit (OAKS 1966) et il pourrait rester relativement inaltéré au cours du vieillissement. En revanche, l'acide aspartique exsudé, variable, proviendrait des pools en contact direct avec le milieu extérieur à la cellule : le "pool extensible", selon COWIE (1962) ; le "pool soluble", selon OAKS (1965).

4. ACTION D'UNE MORPHACTINE

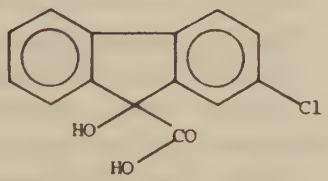
4.1. Introduction

Le nom de "morphactines" désigne l'ensemble des dérivés du fluorène, qui sont des substances actives sur la "morphogenèse" de jeunes plantes. A l'état naturel, ces composés n'existent pas dans la plante et leur activité sur l'allongement fut découverte par HEACOCK et coll. en 1958. Par la suite, il fallait attendre le milieu des années 1960 pour que de nombreux dérivés de la molécule du fluorenol apparaissent. SCHNEIDER (1970), lors de sa revue générale du sujet, ainsi que beaucoup d'autres auteurs ont étudié les propriétés multiples de ces nouveaux effecteurs qui se caractérisent en général par un effet inhibiteur de la croissance.



Molécule de base :

FLUORENE



Dérivé utilisé pour nos expériences :

ACIDE 2-CHLORO-9-HYDROXYFLUORENE-(9)-CARBOXYLIQUE

FRICKE (1967) trouve un ralentissement général de la croissance des algues. ZIEGLER et coll. (1969) ainsi que KAUSHIK et LAL (1974) mesurent une diminution de la longueur pour les jeunes racines de Pois, alors que SCHNEIDER (1967) et ALLEWEDT (1969) constatent un retard pour la formation des racines de cals.

Au niveau cellulaire, c'est l'inhibition de la mitose qui est un des effets les mieux admis (FRICKE 1967; MOHR et coll. 1967; RINGE et VON DENFFER 1967; SCHNEIDER 1967).

Pourtant des effets de stimulation de croissance ont été observés sur les coléoptiles de Blé (KRELLE et LIBBERT 1968) et sur les épicotyles de Lentille (PILET 1970). L'action inhibitrice ou stimulatrice peut dépendre de leur concentration ou de la présence de diverses phytohormones, telles que l'acide β-indolyl acétique ou les gibbérellines (KATSUMI 1973).

Certains auteurs attribuent à la morphactine la propriété de retarder la sénescence, concrétisée par une conservation plus longue de la chlorophylle dans les organes excisés (MOHR et coll. 1966; SCHNEIDER et coll. 1967; SCHNEIDER 1969; LORENZEN et WEISBRICH 1969).

Peu d'observations ont été rapportées concernant les variations du métabolisme de l'azote à la suite d'un traitement à la morphactine. Une forte diminution de l'azote total par rapport au poids sec a été toutefois observée sur les cotylédons d'une cardamine (LORENZEN et WEISBRICH 1969). Dans les exsudats de tiges de tomate traitées à la morphactine, BUCHENAUER et GROSSMANN (1969) mentionnent une augmentation de la concentration de certains AA libres, tels que l'arginine, la thréonine, la lysine, la sérine et l'alanine.

Ce chapitre, qui complète notre publication de 1975 (KELLER et PILET), traitera de l'effet d'une morphactine sur l'élongation, le poids ainsi que sur la teneur en azote et en AA de jeunes racines de Lentille.

4.2. Technique d'incubation

Après la culture des racines de Lentille (Chap 1.A.1.), on sélectionne les plantes dont les racines ont 18 mm. Celles-ci sont trempées dans une solution de morphactine (IT 3299: acide 2-chloro-9-hydroxyfluorène-(9)-carboxylique) à 10^{-5} M, puis déposées dans des boîtes de Pétri sur un fond de coton et de papier filtre imbibés par la même solution. Après 48 h (obscurité, 25 °C), les racines sont coupées et leur longueur mesurée. On détermine leur poids frais et, après lyophilisation, leur poids sec. Les analyses de l'azote et des AA sont effectuées selon les techniques décrites au chapitre I.B.

4.3. Résultats

4.3.1. L'élongation, le poids et l'azote

Les valeurs obtenues sont présentées dans le tableau XXVI; elles montrent que la morphactine inhibe fortement l'élongation des racines en provoquant une diminution du poids frais et du poids sec, malgré un certain épaississement observé. L'azote soluble diminue ou augmente suivant qu'il est exprimé en fonction d'unités de racines ou du poids sec. Les valeurs de l'azote non soluble et de l'azote total décroissent.

Notons qu'un traitement à la morphactine de plantes dont les racines étaient sélectionnées à 6, respectivement à 36 mm, donne des différences de même signe que ci-dessus. Seul l'azote soluble par rapport au poids sec des racines de 6 mm diminue légèrement au lieu d'augmenter. Une dose de 10^{-3} M de morphactine

TABLEAU XXVI

Différences de la longueur, du poids frais, du poids sec, de l'azote soluble, non soluble et total, ainsi que du rapport de ces valeurs pour les racines de Lentille témoins ou traitées à la morphactine IT 3299, à 10^{-5} M

Temps	0h	48h		
Paramètre	TE	TE	TR	%
Longueur (mm)	18,0	38,0	28,5	-25,0
PF (g/100 r)	1,85	3,71	3,26	-12,13
PS (g/100 r)	0,21	0,34	0,31	- 8,82
PF/PS	8,81	10,91	10,52	- 3,57
mg Ns/100 mg PS	2,51	2,98	3,11	+ 4,36
mg Nns/100 mg PS	1,87	2,05	1,66	-19,02
mg Ntot/100 mg PS	4,38	5,03	4,77	- 5,17
Ns/Nns	1,34	1,45	1,87	+28,97
mg Ns/100 r	5,13	9,91	9,33	- 5,85
mg Nns/100 r	3,94	6,88	4,98	-27,62
mg Ntot/100 r	9,07	16,88	14,31	-15,23

TE : racines témoins
TR : racines traitées
% = 10^2. (TR-TE)/TE
PF : poids frais
PS : poids sec
Ns : azote soluble à l'éthanol 70%
Nns : azote non soluble à l'éthanol 70%
Ntot : somme de l'azote soluble et non soluble
r : racine

cause des effets similaires, légèrement accentués par rapport à la dose de 10^{-5} M.

4.3.2. Les acides aminés libres

Les différences des AA libres après le traitement ont été portées dans le tableau XXVII. Beaucoup de différences dont la probabilité de signification statistique n'atteint pas 95%, seront néanmoins considérées à titre indicatif.

A la suite du traitement, les valeurs des AA libres varient dans les deux sens et l'on note autant de différences positives que négatives. Parmi les valeurs significatives, seule la teneur en acide aspartique augmente, alors que celle de cinq autres AA décroît.

4.3.3. Les acides aminés protéiniques

Les différences des AA protéiniques à la suite de l'action de la morphactine figurent également dans le tableau XXVII. Cette fois, l'effet du traitement est clair, car la valeur de tous les AA diminue fortement. La majorité des résultats est significative et les différences s'échelonnent entre 4,8 et 33,8% par rapport aux valeurs des racines témoins.

4.4. Discussion

Cette discussion sera centrée sur les trois thèmes suivants :

TABLEAU XXVII

Différences relatives en acides aminés libres et protéiniques pour des racines de Lentille (I8 mm) traitées à la morphactine par rapport aux racines témoin. Traitement : pendant 48 h à la morphactine IT 3299, à 10^{-5}M

	%			%	
Ac.Aminés	Libres	Protéin.	Ac.Aminés	Libres	Protéin.
$MetSO_{(2)}$	+ 15,2(*)	—	Ile	+ 4,1(*)	- 11,8
Asp	+ 25,0	- 20,7	Leu	- 1,0(*)	- 24,8
Thr	+ 1,9(*)	- 23,7(*)	Tyr	- 5,5(*)	- 7,1(*)
Asn	- 36,1	—	Phe	0,0(*)	- 17,3
Ser	- 32,3	- 23,6	ɣ-Abu	+ 14,3(*)	—
Glu	+ 22,4(*)	- 19,6	$EtNH_2$	- 18,8(*)	—
Pro	+ 18,5(*)	- 33,2	NH_3	+ 9,9(*)	- 4,8(*)
Gly	- 20,7	- 15,3(*)	Lys	+ 0,5(*)	- 33,8
Ala	- 14,4	- 16,8	ε-MeLys	+ 18,8(*)	—
Val	- 20,1	- 12,7(*)	His	- 11,3(*)	- 18,3(*)
			Arg	- 8,3(*)	- 30,7

$\% = 10^2 . (TR-TE) / TE$

$MetSO_{(2)}$: méthionine et méthionine sulfoxydes

(*) : différences non significatives pour P = 0,05

- comparaison de l'effet d'autres inhibiteurs de croissance sur la teneur en azote et en AA;

- essai d'interprétation des variations observées de divers AA;

- inhibition probable par la morphactine, du flux des AA depuis les cotylédons.

1) KNYPL (1967) et CIRELI (1972) ont examiné l'effet de divers inhibiteurs de croissance tels que la coumarine, la colchicine (chlorure de 2-chloroéthyl triméthylammonium), ou le phosphon sur les teneurs en azote ou en AA. Quoique ces substances ont fort probablement un mécanisme d'action différent de celui de la morphactine dans la plante (KOEHLER 1968; SCHNEIDER 1969; ZIEGLER et coll. 1969), on note une série d'effets communs sur les valeurs azotées. En dépit de la différence du matériel, des conditions d'expérience, de la concentration et des critères de référence, on peut résumer comme suit les variations dues à l'action de la morphactine ou de chacun des inhibiteurs ci-dessus :

- diminution de la teneur en azote total, soluble et non soluble, sauf chez KNYPL (1967) qui trouve une augmentation de l'azote protéinique après le traitement à la coumarine, au phosphon et à la colchicine;

- diminution de la teneur en AA totaux (libres plus hydrolysés), excepté les valeurs de l'acide aspartique, de la lysine, de la thréonine et de l'histidine, qui augmentent après le traitement à la coumarine et à la colchicine. La seule augmentation statistiquement significative après l'action de la morphactine est celle de l'acide aspartique libre.

2) Certaines différences positives ou négatives des AA libres à la suite du traitement à la morphactine peuvent révéler des voies préférentielles de transformation au sein des cinq "familles" d'AA. Cette notion vérifiée par COWIE et WALTON (1956) et reprise par STEWARD et DURZAN (1965) ainsi que par FOWDEN (1973) met en évidence l'interdépendance métabolique de certains AA.

- La première famille, basée sur les composés du cycle de Krebs-Henseleit que nous avons déjà vu au no. 1.3., comprend entre autres l'arginine, l'acide glutamique et la proline. Le traitement à la morphactine provoque une diminution du premier composé et une augmentation des deux autres. Il semble donc qu'à la suite du traitement, les transformations soient orientées préférentiellement depuis l'arginine et l'ornithine (étape de courte durée) vers l'acide glutamique qui peut se transformer ensuite en proline.

- La forte baisse de la teneur en asparagine dans le deuxième groupe semble causer l'accroissement des autres composants: acide aspartique, méthionine (oxydée), thréonine et lysine.

- Les AA de la troisième famille (sérine, glycine) et ceux de la quatrième (leucine, alanine, valine) se forment directement à partir du 3-P hydroxypyruvate et du pyruvate. Comme tous les AA de ces familles diminuent en concentration, il est possible que la transformation du 3-P hydroxypyruvate en pyruvate se soit intensifiée. A partir de ce dernier on peut imaginer une orientation plus forte vers le cycle citrique, ce qui se répercuterait dans les valeurs plus élevées des acides aspartique et glutamique, pour lesquels ce cycle est également une source de synthèse.

- La phénylalanine et la tyrosine, qui appartiennent à la famille des AA cycliques, ne sont que peu ou pas affectés par le traitement à la morphactine.

Il est intéressant de souligner la complémentarité de nos résultats concernant certains AA libres avec les observations signalées de BUCHENAUER et GROSSMANN (1969) dans un exsudat de plantes traitées. Ainsi la baisse de concentration de l'arginine, de la sérine et de l'alanine dans nos racines traitées, pourrait être le résultat d'une exsudation accrue de ces composés.

Remarquons encore que la notion d'indicateur de la vitesse de croissance attribuée à la proline libre, que nous avons rencontré dans la littérature et vérifié lors de nos autres expériences, ne s'applique pas dans ce cas d'inhibition artificielle de la croissance. Au lieu de diminuer, sa valeur augmente en effet de 18,5% et c'est celle de la proline protéinique qui baisse fortement.

3) Comme le taux en azote total diminue par rapport à celui des racines témoins, il n'est pas exclu que la mobilisation de l'azote et des AA des cotylédons vers la racine en croissance soit freinée par la morphactine. Nous constatons en effet que les principaux fournisseurs d'azote en provenance des cotylédons (asparagine, arginine, histidine), se retrouvent à des valeurs sensiblement plus basses dans les racines traitées, alors que les AA acides (notamment les acides aspartique et glutamique) dont nous avons déjà soupçonné la synthèse dans la racine (no. 3.4.), sont présents à des concentrations importantes.

Un effet similaire d'inhibition, sous l'action de la morphactine, a été observé sur le transport basipète de l'acide β-indolyl-acétique dans les épicotyles de Lentille (PILET 1970) et sur celui de quelques glucides dans les racines de Pois (RAO et coll. 1973). Cette réduction des propriétés de transport pourrait être due à une inhibition de la xylogenèse (ROBERTS et SHANKLA 1973) et, au niveau cellulaire, à la forte diminution de la perméabilité du plasmalemme (STRUBE et FELLENBERG 1972). D'autre part, SCHNEIDER (1970) note que la morphactine absorbée par la racine peut être emportée par le flux ascendant jusqu'aux cotylédons. Il est donc possible que la morphactine agisse aussi à ce niveau par un ralentissement de la protéolyse. Cet effet irait de pair avec le retard de sénescence que la morphactine cause selon différents auteurs que nous avons cité dans l'Introduction de ce chapitre.

B. EVOLUTION DU TAUX EN PHOSPHORE DES RACINES DE LENTILLE

1. INTRODUCTION

Dans la cellule végétale, le phosphore est largement réparti sous de nombreuses formes différentes.

En tant que phospholipide, on le trouve dans la paroi cellulaire et dans les lamelles membrannaires des différentes organelles de la cellule (SCHWARZE 1958; PILET 1971; MAZLIAK 1973; MORRE 1975). Dans la vacuole, il est surtout présent sous forme inorganique, alors que 90% des esters phosphorés se retrouvent dans le cytoplasme (BIELESKI 1973).

Le phosphore est présent sous forme de RNA, de DNA, d'enzymes ou de coenzymes, ou encore en combinaison avec des métabolites, tels que les monosaccharides phosphorés. Les coenzymes, tels que les nicotinamide adénine dinucléotides (-phosphates) [NAD (P)] et les flavine adénine mono- ou dinucléotides (FAM, FAD) interviennent notamment dans le transport des électrons. Les pyridoxal phosphates (PP) interviennent dans les réactions de transformation des acides aminés, telles que les transaminations et les décarboxylations, et les adénosine phosphates (AMP, ADP, ATP) assurent le transport du phosphore avec ses liaisons riches en énergie. Quoique ces dernières ne constituent qu'une très faible partie du phosphore total, elles ont la propriété fondamentale de récupérer, d'accumuler et de distribuer l'énergie dans la cellule. Elles interviennent dans la glycolyse respiratoire, dans la photosynthèse et dans la synthèse des protéines ou des acides gras (BANDURSKI et TE MAY CHING 1958; SCHWARZE 1958; MAHLER et CORDES 1971; VAN DEN BOSCH 1974).

Dans la graine cependant, 60 à 90% du phosphore est présent

sous forme de phytine qui constitue la principale réserve phosphorée en vue de la germination. Au cours de celle-ci, diverses phosphatases et ensuite la phytase s'activent considérablement. Dès les premiers jours, les substrats sont déphosphorysés en vue de pourvoir le germe avec du phosphore inorganique (WIAME 1958; PRESBY et FOWDEN 1965; WILLIAMS 1970; MEYER et coll. 1971; MAYER et SHAIN 1974).

Citons également le travail de JENNINGS et WATT (1967) qui donne une répartition intéressante des principales formes du phosphore dans les jeunes pousses de Vigne. PILET et NOVAKOWSKI (1966) ainsi que NOVAKOWSKI (1968) étudient l'effet de l'acide β-indolylacétique sur le phosphore soluble et non soluble à l'acide trichloroacétique (5%) des racines de Lentille (18 mm).

Lors de nos essais sur un matériel similaire, nous avons établi les variations du phosphore soluble ou non soluble à l'éthanol 70%, sur les racines entières de longueurs différentes et le long de celles de 18 mm.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Nous allons examiner d'abord la figure 27 qui comprend les valeurs du phosphore soluble, non soluble et total des racines entières en relation avec leur longueur.

Les teneurs en phosphore total par rapport au poids sec sont relativement constantes pour toutes les racines. Celles du phosphore soluble sont basses pour les racines de 3 mm; elles doublent progressivement jusqu'aux racines de 9 mm et ensuite elles restent assez constantes jusqu'aux racines de 36 mm. L'évolution du taux en phosphore non soluble est de tendance inverse à

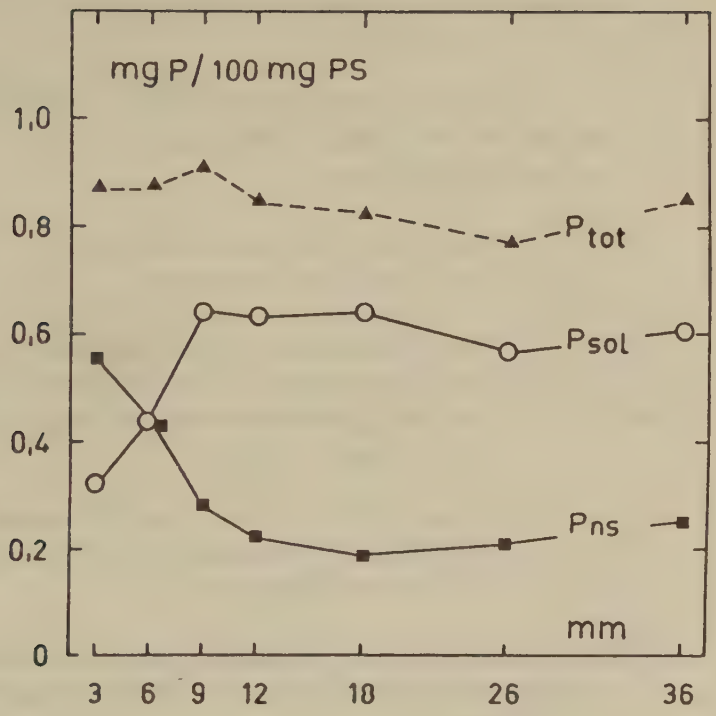


FIGURE 27

Variations de la teneur en phosphore soluble, non soluble et total des racines de Lentille en relation avec la longueur totale (en mm) de ces racines.

la précédente, et on enregistre la concentration la plus faible pour les racines de 18 mm.

Une comparaison avec les valeurs de l'azote, établies dans les mêmes conditions au chapitre III.A.1. (Tab XXII), amène les constatations suivantes :

1) la racine de Lentille contient entre 6 et 7 fois plus d'azote que de phosphore,

2) la part du phosphore soluble par rapport au phosphore non soluble est relativement plus importante que celle de l'azote soluble par rapport à l'azote non soluble;

3) un parallélisme s'établit entre l'évolution des deux paramètres à l'état soluble d'une part, et à l'état non soluble d'autre part.

Par la lecture de la figure 28, on suit les gradients du phosphore soluble, non soluble et total de la racine de Lentille de 18 mm.

Dans la première zone, on trouve une concentration faible du phosphore soluble, mais des teneurs maximales en phosphore non soluble et en phosphore total. Or, WIEBE et KRAMER (1954) ont déjà montré que le phosphore marqué s'accumule préférentiellement dans les pointes de la racine d'Orge.

On peut se demander sous quelle forme se trouvent les quantités importantes de phosphore non soluble dans la première zone. Toute présence de phytine semble exclue, car sa présence se limite pratiquement aux organes de réserve (WIAME 1958; BIELESKI 1973). Les résultats de ce dernier auteur ainsi que ceux

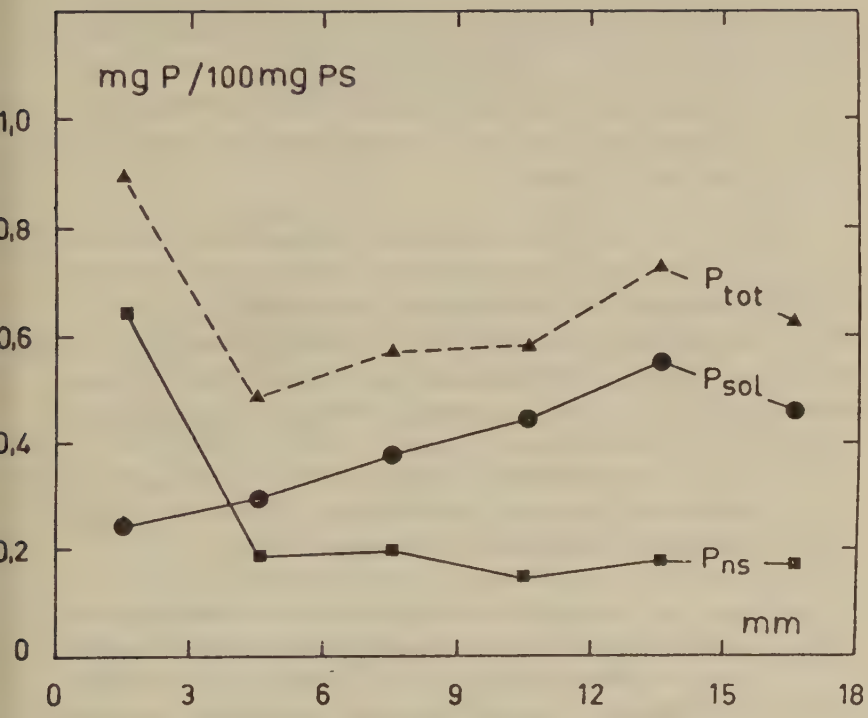


FIGURE 28

Distribution de la teneur en phosphore soluble, non soluble et total le long de la racine de Lentille (de 0 à 18 mm).

de JENNINGS et WATT (1967) montrent que dans la jeune plante, environ 40% du phosphore total se trouve sous forme de RNA et qu'environ 8% sont associés à des protéines. Ils constituent donc une partie importante de la fraction du phosphore non soluble, dans laquelle on trouve également les phospholipides des débris de parois.

Ces résultats appellent les conclusions faites concernant l'étude des gradients de l'azote et des acides aminés (Chap III.A.2.). Le métabolisme très actif de cette zone méristématique se traduit par une protéosynthèse intense - lors de laquelle l'ATP intervient pour la mise en place des acides aminés - et une teneur élevée en RNA (PILET et BRAUN 1970).

A partir de la deuxième zone, le phosphore non soluble est réduit au 1/3 de sa valeur initiale et la nouvelle teneur reste assez invariable jusqu'au collet.

Les concentrations croissantes du phosphore soluble à partir de la deuxième zone entraînent celles, également croissantes du phosphore total. Notons cependant qu'à la dernière zone les valeurs diminuent à nouveau. Cette baisse pourrait être attribuable - comme celle de l'azote soluble - à une perte par guttation entre le moment de l'excision de la racine entière et celui de la segmentation ultérieure.

En conclusion, on peut dire que les résultats du phosphore s'insèrent dans le tableau existant des variations de l'azote, des acides aminés et des différents gradients mentionnés au no. A.2., tout en y apportant la notion importante d'énergie pour les transformations métaboliques.

C. EVOLUTION DU TAUX EN ACIDES AMINES DES RACINES DE MAIS AVEC ESTIMATION QUALITATIVE DE QUELQUES PEPTIDES

1. INTRODUCTION

Après avoir établi les gradients des acides aminés (AA) de la racine de Lentille, nous avons étendu des mesures semblables à une monocotylédone, le Mais. Les analyses sur ce matériel s'inscrivent dans le contexte général du laboratoire, où les racines de Mais sont actuellement l'objet d'une étude détaillée de la croissance (PILET 1972; PILET 1973; JOTTERAND-DOLIVO et PILET 1974).

Concernant les AA, il convient de citer les importantes recherches de OAKS (1963; 1965; OAKS et coll. 1970; OAKS et JOHNSON 1972), qui traitent essentiellement de la biosynthèse, ou du transport (OAKS 1970) de certains AA dans les racines de Mais.

Mentionnons également un travail de SYTNIK et VYNNYCHENKO (1973) qui établit les teneurs en AA dans les jeunes racines de Mais en fonction du nombre de jours de croissance.

2. TECHNIQUES EXPERIMENTALES

2.1. Récolte

Après la culture décrite au chapitre 1.A.1.2., on sélectionne les plantes dont les racines mesurent entre 10 et 15 mm. La portion de 0 à 10 mm depuis l'apex est excisée et ensuite

segmentée en cinq fractions de 2 mm de longueur. La segmentation s'effectue à l'aide d'un scalpel sous la loupe binoculaire. Les segments excisés sont posés dans différents béchers contenant quelques gouttes d'une solution de Ringer (environ 0 ^{o}C).

Les déterminations subséquentes du poids, de l'azote et des AA ont été effectuées de la même façon que pour les racines de Lentille (Chap 1.B.).

2.2. Estimation qualitative de deux peptides

Comme nous le verrons ci-dessous, le chromatogramme de l'extrait des racines de Mais (Fig 29) contient également deux peptides dont nous nous sommes proposés d'analyser la composition en AA. Il s'agit des pics no. 4 et no. 13, qui se caractérisent à la fois par une bonne séparation et une surface relativement importante.

L'opération consiste à monter une dérivation pour l'éluat de la colonne dont une partie aliquote est dirigée vers le système analytique qui trace le chromatogramme hibituel. Le reste de l'éluat est pompé vers un collecteur de fractions.

Au départ il est nécessaire d'appliquer une charge environ quatre fois plus importante, en vue de disposer de suffisamment de matériel pour l'analyse ultérieure. Au bas de la colonne, on fixe un séparateur de flux du type "A_{10}". Ce dernier est relié à deux tubes différents de la pompe péristaltique. Le premier (0,42 ml/min) dirige une partie aliquote de l'éluat, auquel s'est ajouté le sulfate d'hydrazine (0,32 ml/min), vers le système analytique; le second (0,42 ml/min) pompe le reste de l'éluat vers le collecteur de fractions. Ce dernier a été reglé pour changer d'éprouvette

toutes les deux minutes, ce qui est un temps suffisamment court pour récolter un peptide sans contamination par l'AA sortant juste avant ou après de la colonne. Pour repérer le tube correspondant au pic du peptide donné, il suffit de tenir compte de la durée de passage à travers le système analytique (19 min et 50 sec) d'une part et, d'autre part, du trajet jusqu'au collecteur de fractions (1 min et 50 sec).

Après l'adjonction d'un volume identique d'acide chlorhydrique 6 N, le contenu du tube choisi est hydrolysé pendant 3 h à 110 °C. L'échantillon est ensuite porté à un pH d'environ 1,8 à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium 6 N, après quoi l'on peut procéder à l'analyse chromatographique des AA libérés.

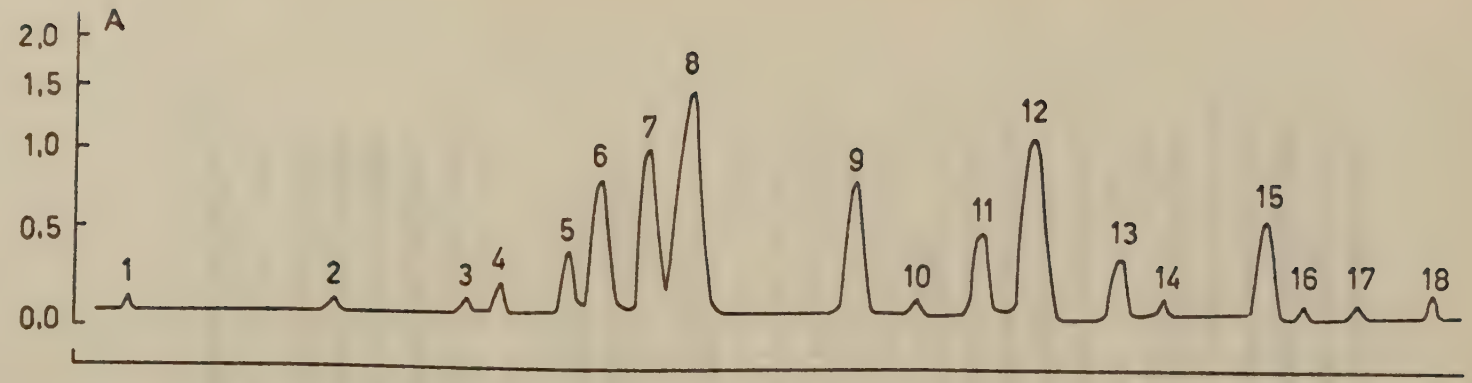
3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Chromatogramme-type de l'extrait éthanolique

L'extrait des racines entières de Maïs (10 à 15 mm) donne un chromatogramme de 31 substances positives à la ninhydrine. Celles-ci sont représentées à la figure 29 avec, en plus, la norleucine en tant qu'étalon interne.

Tous les pics ont pu être identifiés selon nos critères de comparaison du temps d'élution et de surcharge de substances connues. A cet effet, nous avons utilisé deux systèmes de tampon différant par leurs pH et leurs sels (sodium ou lithium). De plus, l'hydrolyse partielle a révélé la présence de deux peptides dont il a été question ci-dessus.

Par opposition à l'extrait de racines de Lentille (Fig 16),


A
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18

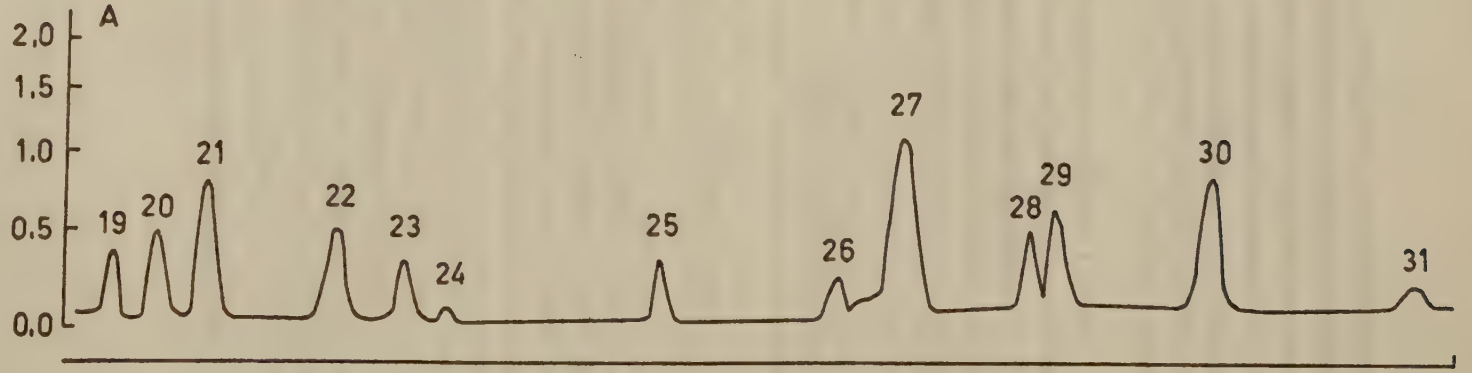

A
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

FIGURE 29

FIGURE 29

Chromatogramme-type des acides aminés libres de racines de Mais (10 mm).

Charge : 100 µl, ce qui correspond à 2 mg de matériel sec,
50 µl de Norleucine à 2,5 µM/ml (étalon interne).

Identification des pics :

1.Acide cystéique - 2.Méthionine sulfoxyde - 3.Méthionine sulfone - 4.Peptide 1 - 5.Acide aspartique - 6.Thréonine - 7.Asparagine - 8.Sérine - 9.Acide glutamique - 10.Proline - 11.Glycine - 12. Alanine - 13.Peptide 2 - 14.Acide alpha-aminobutyrique - 15.Valine - 16.½Cystine - 17.Cystathionine - 18.Méthionine - 19.Isoleucine - 20.Leucine - 21.Norleucine - 22.Tyrosine - 23.Phénylalanine - 24.bêta-Alanine - 25.Acide gamma-aminobutyrique - 26.Ethanolamine - 27.Ammoniaque - 28.Lysine - 29.1-Méthyllysine - 30.Histidine - 31.Arginine.

ce chromatogramme est nettement moins chargé, car il comporte dix pics en moins. Rappelons que dans l'extrait des racines de Lentille, il n'y avait pas moins de 7 peptides et 4 substances non identifiées. L'acide α-aminobutyrique et la l-méthylhistine sont les seuls composés présents dans l'extrait des racines de Mais qui n'ont pas été mis en évidence dans celui des racines de Lentille. Notons cependant que la distinction entre la l-méthylhistidine et la ε-méthyllysine (identifiée dans les racines de Lentille) n'est pas absolument certaine selon nos critères ci-dessus. D'après ces mêmes critères, l'urée, la glutamine, le glutathion oxydé, l'acide β-aminobutyrique, l'ornithine et la ε-méthyllysine trouvés - généralement sous forme de "traces" - dans les racines de Lentille, n'ont pu être révélés dans celles du Mais. Dans ce dernier matériel, les pics de l'asparagine et de la valine sont nettement moins élevés; en revanche, celui de l'alanine est plus important, ce qui confirme les résultats de OAKS (1966) ainsi que ceux de SYTNIK et VYNNYCHENKO (1973).

3.2. Le poids et l'azote

Pour les cinq segments de 2 mm de longueur, nous avons d'abord déterminé le poids frais, le poids sec, la teneur en azote soluble ou non, et celle de l'azote total (Tab XXVIII). Pour le moment, nous ne tenons pas compte des deux dernières colonnes de résultats relatifs à la racine entière : elles seront commentées dans le paragraphe à venir no. 3.5..

Les autres résultats, représentant les valeurs le long de la racine, se caractérisent par des tendances comparables à celles des gradients établis pour la racine de Lentille (Tab XXIV). Ceci n'est pas surprenant, car la germination de l'une ou de l'autre espèce entraîne des transformations semblables au point

TABLEAU XXVIII

Valeurs du poids frais, du poids sec, de l'azote soluble, ou insoluble et du rapport de ces valeurs le long de l'axe de la racine de Maïs (de 0 à 10 mm). Calcul de la différence relative de ces valeurs par rapport à la racine entière.

Zones (mm)	0-2	2-4	4-6	6-8	8-10	0-10	%
PF g/100 r)	0,27	0,36	0,42	0,49	0,55	1,24	+ 68,55
PS (mg/100 r)	32,70	39,50	30,20	30,20	33,70	158,90	+ 4,66
PF/PS (g/g)	8,25	9,11	13,91	16,23	16,32	7,80	+ 61,15
mg Ns/100mg PS	0,97	1,32	1,82	1,85	2,07	1,64	- 3,05
mg Nns/100mg PS	8.30	4,38	2,90	2,09	2,07	3,93	+ 1,78
mg Ntot/100mg PS	9,27	5,70	4,72	3,94	4,14	5,57	+ 0,36
Ns/Nns	0,12	0,30	0,63	0,89	1,00	0,42	- 5,00

r : racines

% = 10^2. (r segmentées - r entières)/r entières

PF : poids frais

PS : poids sec

Ns : azote soluble à l'éthanol 70%

Nns : azote non soluble à l'éthanol 70%

Ntot : somme de l'azote soluble et non soluble

de vue azoté. Pour les Lentilles, elles ont été décrites aux chapitres précédents et pour le Mais, elles ont été étudiées notamment par les auteurs suivants : AHUJA et coll. (1973, SODEK et WILSON (1973), HARVEY (1974) ainsi que par HARVEY et OAKS (1975).

Il est néanmoins intéressant de faire une comparaison plus détaillée des gradients racinaires de la Lentille et du Mais :

- la deuxième zone de la racine de Lentille représente le segment le plus léger (poids sec), alors que pour le Mais, le segment correspondant est le plus lourd;

- toutes les valeurs de l'azote soluble sont plus élevées pour la Lentille, celles de l'azote non soluble par contre sont plus élevées pour le Mais. Cette proportion différente ressort particulièrement bien du rapport azote soluble/azote non soluble, qui est en moyenne 70% plus élevé pour la racine de Lentille;

- le taux en azote total est nettement plus élevé dans les deux premières zones de la racine de Mais; dans les deux dernières par contre, il est devenu plus bas. Concernant l'évolution du gradient le long de la racine, le taux en azote total reflète cependant un réel parallélisme entre les deux matériels : une diminution importante des valeurs depuis l'apex jusqu'à une distance de 6 mm et ensuite une relative constance jusqu'au collet.

3.3. Les acides aminés libres et protéiniques

Nous avons porté les concentrations des AA (libres et protéiniques) dans le tableau XXIX. Après avoir déjà évoqué certaines différences qualitatives et quantitatives entre les pics des chromatogrammes, nous poursuivons la comparaison entre les deux matériels au niveau des gradients des AA :

- l'acide glutamique est de nouveau le seul AA libre dont l'évolution de la concentration est différente de celle des autres. Ceci confirme les résultats de la racine de Lentille. La teneur élevée de cet AA dans les tissus méristématiques semble donc confirmer son rôle important de plaque tournante du métabolisme.

  Notons que les valeurs constantes du produit de décarboxylation, l'acide δ-aminobutyrique, se retrouvent également pour les racines de Mais;

- la pente de la proline est encore nettement plus faible que les autres le long de la racine. Elle reflète la teneur relativement importante de cet AA dans les premières zones où la vitesse de croissance est plus grande;

- la diminution du taux en certains AA, remarquée pour la dernière zone des racines de Lentille, est partiellement retrouvée pour les racines de Mais. Tel est le cas pour la sérine, l'isoleucine, la leucine, la lysine et la phénylalanine. En revanche, les fortes pertes de la valine et de l'histidine ainsi que celles, moindres de l'asparagine, de la

TABLEAU XXIX

Valeurs des principaux acides aminés libres, ou protéiniques le long de l'axe de la racine de Maïs (de 0 à 10 mm). Calcul de la différence relative de ces valeurs par rapport à la racine entière.

Zones (mm)	0-2	2-4	4-6	6-8	8-10	0-10	%
Asp	1,23	1,39	1,60	2,38	3,78	1,78	+ 15,73
	18,29	13,11	9,70	7,83	7,12	12,46	- 8,99
Thr	1,49	3,43	4,99	5,84	8,15	6,48	- 27,01
	12,36	8,37	6,48	5,63	4,67	8,59	- 11,99
Asn	1,09	2,72	7,03	9,79	15,56	12,68	- 44,24
	--	--	--	--	--	--	--
Ser	4,58	7,35	15,10	12,97	12,67	12,25	- 15,84
	12,44	9,09	6,77	6,73	4,70	9,52	- 11,66
Glu	3,61	3,58	2,91	2,84	3,02	3,45	- 6,67
	18,64	12,62	8,78	9,59	6,27	14,09	- 20,01
Pro	1,74	1,88	2,36	2,43	2,54	3,81	- 43,04
	11,32	9,54	6,36	7,43	4,76	9,79	- 18,69
Gly	1,01	1,57	2,93	3,68	4,44	3,04	- 12,17
	21,19	15,79	9,40	10,36	7,65	15,31	- 14,70
Ala	3,98	4,13	6,48	11,40	14,26	6,55	+ 20,61
	21,16	14,19	11,37	10,97	7,48	15,66	- 16,35
α-Abu	tr.	tr.	1,02	1,16	1,15	1,21	--
	--	--	--	--	--	--	--
Val	1,57	1,96	2,70	3,72	4,06	2,71	+ 1,85
	17,05	12,88	9,44	8,68	6,59	12,31	- 10,32
½Cys	1,06	1,24	0,89	1,35	1,24	1,04	+ 11,54
	tr	tr	tr	tr	tr	tr	--

TABLEAU XXIX (suite)

Zones (mm)	0-2	2-4	4-6	6-8	8-10	0-10	%
Ile	1,03	1,10	1,36	1,53	1,51	1,28	+ 1,56
	15,09	10,75	8,10	6,73	5,79	9,99	+ 17,42
Leu	1,23	1,29	1,78	1,95	1,78	1,52	+ 4,61
	20,18	14,53	10,79	8,80	7,55	14,05	- 10,96
Tyr	1,59	1,79	2,26	2,39	2,55	1,97	+ 6,60
	13,66	9,05	6,76	5,56	6,11	8,63	- 3,71
Phe	1,38	1,44	2,00	2,23	2,06	1,72	+ 5,81
	15,72	9,43	8,15	6,91	7,08	10,39	- 8,57
β-Ala	tr	tr	tr	3,08	4,16	3,95	--
	--	--	--	--	--	--	--
γ-Abu	1,43	1,41	1,49	1,51	1,87	1,43	+ 7,69
	--	--	--	--	--	--	--
$EtNH_2$	3,79	4,20	4,11	3,97	3,73	4,41	- 9,98
	--	--	--	--	--	--	--
NH_3	2,99	4,92	4,05	4,54	4,56	3,19	+ 32,92
	39,30	25,87	21,41	19,25	17,05	22,00	+ 12,32
Lys	1,28	1,55	1,34	2,07	2,03	1,59	+ 3,77
	18,41	14,24	8,14	7,15	7,51	10,87	+ 3,96
1-MeHis	2,43	2,44	2,91	3,05	2,98	2,41	+ 13,69
	--	--	--	--	--	--	--
His	2,73	3,07	3,39	3,80	4,25	3,12	+ 9,94
	17,15	10,96	7,90	7,48	8,38	9,74	+ 9,49
Arg	tr	tr	1,90	2,31	2,80	1,93	--
	25,10	16,45	13,02	10,71	9,75	14,78	+ 2,37
Pept.1	1,36	1,45	1,40	1,40	1,30	1,45	- 4,83
	--	--	--	--	--	--	--
Pept.2	2,34	2,96	2,73	2,93	2,77	3,01	- 8,64
	--	--	--	--	--	--	--

% = 10^2.(r segmentées - r entières)/r entières
r : racines
tr : traces

thréonine et de l'alanine ne sont pas confirmées pour les racines de Mais;

- les deux peptides ne suivent pas une tendance définie le long de l'axe, ceci était déjà le cas pour les peptides des racines de Lentille en fonction de la longueur.

3.4. La composition des peptides extraits

Comme nous avons vu ci-dessus, les pics no.4 et no.13 du chromatogramme de l'extrait de racines de Mais représentent des peptides que nous avons pu isoler, hydrolyser et réanalyser.

Les résultats obtenus, qui figurent dans le tableau XXX, indiquent une répartition assez équitable entre les mêmes cinq AA : acides aspartique et glutamique, sérine, glycine et alanine. Seul le pic no.4 contient plus d'acide aspartique et très peu de sérine. L'ammoniaque, présent sous forme de traces semble surtout provenir d'une dégradation partielle de la sérine, comme nous avons vu au début de ce travail.

Il est intéressant de remarquer que les cinq AA constitutifs sont identiques à ceux que l'on trouve en de fortes proportions dans les protéines racinaires. Si l'on considère également l'absence d'AA basiques dans ces peptides, on peut émettre une hypothèse sur leur origine. Probablement celle-ci n'est pas dans les cotylédons, où nous savons que les composés basiques dominent. Tout porte à croire au contraire, que ces peptides sont le résultat d'une synthèse de novo dans la jeune racine.

TABLEAU XXX

Composition en acides aminés de deux peptides solubles, isolés de racines de Mais (10 mm) et soumis à une hydrolyse modérée (3 h, 110 °C, concentration finale en HCl:3N)

Acides aminés constitutifs	Peptide 1	Peptide 2
Asp	29,2 %	21,7 %
Ser	tr	20,5 %
Glu	23,6 %	15,7 %
Gly	25,0 %	20,5 %
Ala	22,2 %	21,7 %
NH_3	tr	tr

Le peptide 1 correspond au pic no. 4 et
le peptide 2 correspond au pic no. 13 du chromatogramme (Fig 29).

% : teneur relative

tr : traces

3.5. Bilans du poids, de l'azote et des acides aminés

Comme nous l'avons annoncé, les tableaux XXVIII et XXIX ont permis de dresser un bilan entre les racines entières et les racines segmentées. Pour ces dernières, on additionne les valeurs des cinq zones, en tenant compte de leur contribution en poids sec, pour établir la concentration finale d'une racine segmentée. La différence relative de concentration de la racine segmentée par rapport à la non segmentée, est exprimée en pourcents à la dernière colonne des deux tableaux.

D'après le tableau XXVIII, la segmentation entraîne une forte augmentation du poids frais. Elle s'explique partiellement par une absorption active de la solution de Ringer (VAN STEVENINCK 1975) dans laquelle les segments racinaires sont déposés momentanément. De plus, ces derniers n'ont pratiquement pas été séchés avant la détermination du poids frais, pour éviter de perdre des composés azotés en exsudation. Les autres différences de ce tableau sont assez faibles. Notons cependant une légère diminution relative de la valeur en azote soluble pour les racines segmentées.

Pour les AA (Tab XXIX), on note en général des différences inférieures à 20%. Par extrapolation des coéfficients de reproductibilité obtenus sur les racines de Lentille (Tab XV et XVI), on peut conclure que beaucoup de ces différences ne sont pas significatives.

On remarque cependant quelques exceptions intéressantes parmi les AA libres : les racines segmentées contiennent environ 44% moins d'asparagine, 43% moins de proline et 27% moins de thréonine! A première vue on pourrait penser que ces AA seraient préférentiellement exsudés par les segments de 2 mm, alors que pour la racine entière une pareille perte est moins probable. Cette

hypothèse peut convenir pour l'asparagine qui est facilement exsudée selon les travaux de CHRISTIANSEN (1950) et PATE (1962) et d'après nos propres conclusions (Chap III.3.4.). Notons cependant que d'après les résultats du tableau XXVIII), les pertes en azote soluble devraient être assez faibles (-3,05% relatif).

On peut se demander si la grande diminution de concentration de la proline libre (et dans une moindre mesure, de la proline protéinique) peut de nouveau être en rapport avec une croissance freinée. On peut en effet imaginer que cette dernière soit arrêtée plus brusquement dans les racines segmentées que dans les racines intactes. Dans ce cas, la différence confirmerait notre constatation antérieure (Chap III.1.3.; 3.4. et 4.4.), que la teneur en proline libre est un indicateur de la vitesse de croissance (sauf pour une inhibition de croissance à la suite d'un traitement à la morphactine).

L'examen des AA protéiniques révèle en général une diminution des valeurs pour les racines segmentées. Ces différences suggèrent qu'à la suite de la segmentation, la racine puisse subir un début de protéolyse, d'autant plus que la concentration de l'ammoniaque (soluble ou insoluble) est devenue nettement plus élevée.

CONCLUSIONS GENERALES

A) Les déterminations de l'azote et du phosphore total, ainsi que les chromatographies des acides aminés ont été précédées d'une étude approfondie des techniques de préparation de l'échantillon et des systèmes automatiques d'analyse :

1) L'extraction des acides aminés

- La solution éthanol/eau à 70% v/v a été préférée à celles, testées, d'un tampon phosphate à pH=7, d'acide trichloracétique et au mélange phénol/acide acétique/eau.

- Le rendement de l'extraction (5 fois 5 min) a été évalué à 89,9% et sa reproductibilité pour un matériel donné, à 2,17%.

2) L'hydrolyse des protéines

- La durée optimale de l'hydrolyse du culot éthanolique a été choisie à 30 h. Seules les pertes de la sérine doivent être compensées par calcul (+18,5%).

- L'hydrolyse effectuée en présence d'amidon cause, en général, une légère augmentation des résultats d'acides aminés.

3) La détermination de l'azote et du phosphore total dans les solutions de l'extrait et de l'hydrolysat

- Les essais sur le système entièrement automatique "Digesteur continu" ont donné un rendement de plus de 99% d'azote par rapport au test manuel de Kjehldahl pris comme référence; la reproductibilité est de 1,28% et la contamination entre deux échantillons successifs a été évaluée entre 0,23 et 0,86%. Pour ce dernier calcul une nouvelle formule est proposée.

- Le "Block digestor", un système semi-automatique, a donné un rendement de plus de 97% et un coefficient de variation de 0,90%; la contamination, jugée insignifiante, n'a pas été déterminée.

4) La détermination des acides aminés

Pour l'extrait des racines de Lentille 41 pics positifs à la ninhydrine ont été séparés : 30 pics représentent des acides aminés, 7 semblent être des peptides et 4 restent inconnus. L'extrait des racines de Mais comporte 30 pics, dont 28 acides aminés et 2 peptides dont la composition en acides aminés a été mesurée.

- Les concentrations, retenues avec un intervalle de confiance à 95%, sont dominées par une teneur extrêmement élevée de l'asparagine. En revanche, d'autres substances (8 pour la Lentille et 1 pour le Mais) sont seulement présentes sous forme de traces.

- Le culot hydrolysé donne 17 acides aminés et l'ammoniaque, qui sont constitutifs des protéines.

- La conservation des racines, lyophilisées ou non, au congélateur pendant 13 mois, cause des baisses de concentrations sensibles de presque tous les acides aminés.

B) Les résultats des acides aminés libres ou protéiniques, qui se caractérisent en général par une évolution parallèle, montrent les tendances suivantes :

1) - Les teneurs sont élevées en acides aminés protéiniques et simultanément faibles en acides aminés libres dans les tissus à prédominance méristématique. Cette observation a été faite pour la zone apicale des racines de 18 mm, et dans une moindre mesure, pour les racines dont la longueur totale est inférieure à 12 mm.

- Dans les tissus plus âgés, la concentration en acides aminés protéiniques est plus basse et celle des acides aminés libres est plus élevée. Elle reste relativement constante pour les zones no. 2 à 6 et pour les racines entières de 12 à 36 mm.

2) L'évolution du phosphore et de l'azote solubles et non solubles est semblable à celle des acides aminés ci-dessus.

3) Le vieillissement des racines de Lentille cause d'importantes pertes de l'azote et des acides aminés. Ce phénomène a été expliqué par une accélération de la protéolyse et des pertes importantes par exsudation.

4) Le traitement des racines à la morphactine cause une diminution de l'allongement, de la valeur en azote total et de tous les acides aminés protéiniques. L'effet sur les acides aminés libres est varié. Il est suggéré que la morphactine agisse à la fois au niveau du cotylédon où elle ralentirait la protéolyse, et par une inhibition du transport dans la racine.

5) L'effet de la segmentation de la racine de Mais se traduit par une diminution de la plupart des acides aminés protéiniques et une perte importante d'asparagine, de thréonine et de proline.

6) Pour certains acides aminés nous avons pu dégager un rôle spécial en rapport avec la croissance :

- Les expériences sur la racine entière et celles concernant le vieillissement suggèrent que l'arginine, l'asparagine et certains autres acides aminés basiques, riches en azote, sont les constituants essentiels du flux nutritif en provenance des cotylédons. Dans le métabolisme racinaire, ils joueraient essentiellement le rôle de fournisseurs d'azote. Les acides aminés acides par contre, seraient le résultat d'une synthèse de novo dans le tissu embryonnaire.

- L'évolution des teneurs en arginine et en acide glutamique libres d'une part, l'absence de la citrulline d'autre part, indiquent que le cycle de Krebs-Henseleit n'est que rarement bouclé et que la transformation des quantités importantes d'arginine libre s'effectue surtout en direction de l'acide glutamique libre.

- Ce dernier acide aminé, à qui on attribue un rôle de plaque tournante dans le métabolisme, est le seul à être plus concentré dans les tissus méristématiques que dans les tissus plus âgés.

- La teneur en proline libre croît en général avec la vitesse de croissance de la racine analysée. Les variations de ce composé sont opposées à celles, décrites dans la littérature,

de l'hydroxyproline protéinique. L'accélération de la croissance semble donc activer l'incorporation connue de la proline libre dans les protéines où l'hydroxylation suit immédiatement. Comme l'hydroxyproline protéinique, la proline libre peut, par ses variations de concentration, indiquer l'état de croissance d'un tissu.

ZUSAMMENFASSUNG

Vor Beginn der pflanzlichen Versuche wurden die Arbeitsmethoden optimiert und die Analysenautomaten eingehend getestet.

Für die Aminosäurenextraktion wurde von verschiedenen Lösungen 70-prozentiges Ethanol ausgewählt. Die Ausbeute der 25-minütigen Extraktion wurde auf 89,9% berechnet. Die Optimaldauer der Proteinhydrolyse wurde nach diversen Versuchen auf 30 Stunden (110 Grad, HCl 6 N) festgelegt. Die Zugabe von grösseren Mengen Stärke hat einen Anstieg der meisten Aminosäurenkonzentrationen zur Folge.

Die Bestimmung von Gesamtstickstoff und -phosphor wurden entweder vollautomatisch (mit dem "kontinuierlichen Digestor") oder halbautomatisch (mit dem "Block Digestor" und dem AutoAnalyser) ausgeführt. Bei beiden Methoden wurden die Ausbeute, die Reproduzierbarkeit und die Kontamination zwischen zwei aufeinanderfolgenden Proben bestimmt. Für letztere Berechnung wurde eine neue Formel aufgestellt.

Die Bestimmung der Aminosäuren wurde mit einem vollautomatischen Ionenaustausch-Analysator ausgeführt. Der Extrakt von Linsenwurzeln ergab 41 ninhydrin-positive Peaks, derjenige von Maiswurzeln 30 Peaks. Die meisten Peaks konnten als Aminosäuren oder als kleine Peptide identifiziert werden; einige bleiben jedoch unbekannt. Das Proteinhydrolysat ergab generell 17 Aminosäuren sowie Ammoniak. Alle Werte sind im Vertrauensbereich von 95% angegeben. Längeres Konservieren der eingefrorenen Wurzeln verursacht einen Konzentrationsabfall der meisten Aminosäuren.

Der Gehalt an unlöslichem Stickstoff und Phosphor, sowie der proteingebundenen Aminosäuren ist im allgemeinen hoch in den meristemhaltigen Geweben und niedrig in älteren Geweben. Der lösliche Stickstoff und Phosphor sowie die freien Aminosäuren verhalten sich umgekehrt. Freies Asparagin ist am stärksten vertreten.

Das Segmentieren der Wurzeln, ein künstlich hervorgerufener Alterungsprozess, und die Behandlung mit Morphaktin verursachen einen Konzentrationsabfall der meisten freien und gebundenen Aminosäuren.

Gewisse Aminosäuren spielen eine besondere Rolle in Bezug auf das Wachstum : Asparagin, Arginin und die meisten basischen Aminosäuren sind in erster Linie Stickstofflieferanten für den Metabolismus der jungen Zellen. Dort ist die Glutaminsäure eine äusserst wichtige Zwischenstufe für die meisten stickstoffhaltigen Komponenten. Die Konzentration des freien Prolin steht - ausser nach der Morphaktinbehandlung - in einem direkten Verhältnis zur Wachstumsgeschwindigkeit der Wurzeln. Diese Beobachtung deckt sich mit dem bereits beschriebenen Konzentrationsverhältnis von proteingebundenem Hydroxyprolin zum Wachstum von jungem Gewebe.

BIBLIOGRAPHIE

ABDUL-BAKI A.A., 1973 - J. Amer. Hortic. Sc., 98, 181-185.

AHUJA V.P., SRIVASTAVA K.N., AUSTIN A. et NAIK M.S., 1973 - Indian J. Biochem. Biophys., 10, 48-50.

ALLEWELDT G., 1969 - Ber. dtsch.Bot. Ges., N. F., 3, 121-129.

ANDRIES I., GONZALES P. et SANTOS-RUIZ A., 1973 - Physiol. Chem. Phys., 5, 357-364.

ARONOFF S., 1962 - In The Amino Acid Pools, 657-666, Elsevier Publishing Co., Amsterdam.

AUGIER H. et PELLEGRINI M.,1972 - Tethys., 4, 801-810.

BAGDASARIAN M., MATHESON N.A., SYNGE R.L.M. et YOUNGSON M.A., 1964 - Biochem. J., 91-105.

BANDURSKI R.S. et TE MAY CHING , 1958 - In Handbuch der Pflanzenphysiologie, IX, 237-246, Springer Verlag, Berlin.

BARNARD R.A. et OAKS A., 1970 - Can. J. Bot., 48, 1155-1158.

BARNETT N.M. et NAYLOR A.W., 1966 - Plant Physiol., 41, 1222-1230.

BATHURST N.D., 1953 - J. Sc. Fd. Agric., 4, 221-226.

BECKER H.C., MILNER R.T. et NAGEL R.H., 1940 - Cereal Chem., 17, 447-457.

BEEVERS L. et GUERNSEY F.S., 1966 - Plant Physiol., 41, 1455-1455.

BELETSKAYA E.K., 1971 - Fiziol. Rast., 18, 331-338.

BELL P.M., 1963 - Anal. Biochem., 5, 443-451.

BELL E.A. et FELLOWS L.E., 1966 - Nature, 210, 529.

- et TIRIMANNA A.S.L., 1963 - Nature, 197, 901.

BELL E.A. et TIRIMANNA A.S.L., 1965 - Biochem. J., 97, 104-111.

BEMILLER J.N., HOFFMANN W.E. et PAPPELIS A.J., 1972 - Mech. Ageing Dev., 1, 387-401.

BHATTY R.S. et FINLAYSON A.J., 1973 - Can. J. Plant Sc., 53, 651-657.

- , SOSULSKI F.W. et WU K.K., 1973 - Can. J. Plant Sc., 53, 651-657.

BIELESKI R.L., 1973 - Ann. Rev. Plant Physiol., 24, 225-252.

BONNAFE M., 1974 - Recent Advances in Ion Exchange Chromatography, 1-18, In VI. Technicon Symposium, Technicon GMBH, Bad Vilbl, Allemagne.

BONNER J., 1949 - Amer. J. Bot., 36, 323-332.

BOULTER D., 1966 - In Techniques in Amino Acid Analysis, 93-107, Technicon Internat. Division, Genève.

- 1973 - In Phytochemistry, 30-60, Van Nostrand Reinhold Co., New York.

- et BARBER J.T., 1963 - New Phytol., 62, 301-316.

BOUSSINGAULT M., 1868 - Agronomie, Chimie agr. et Physiol., 4, 245-266.

BROWN R., 1965 - In Handbuch der Pflanzenphysiologie, XV, 894-908, Springer Verlag, Berlin.

- et BROADBENT D., 1950 - J. Exptl. Bot., 1, 249-263.

BUCHENAUER H. et GROSSMANN F., 1969 - Ber. dtsch. Bot. Ges., N. F., 3, 149-157.

BURNS J.A., CURTIS C.F. et KACSER H., 1965 - J. Chromatog., 20, 310-318.

CARR D.J. et PATE J.S., 1967 - XXIst. Symposium Soc. exp. Biol., 21, 559-599.

CHIBNALL A.C., 1939 - Protein Metabolism in Plants, Yale University Press, New Haven.

CHIBNALL A.C., 1951 - New Phytol., 53, 31-37.

CHRISPEELS M.J., 1969 - Plant Physiol., 44, 1187-1193.

CHRISTIANSEN G.S., 1950 - Arch. Biochem. Biophys., 29, 354-368.

- et THIMANN K.V., 1950 - Arch. Biochem. Biophys., 28, 117-129.

CIRELI B., 1972 - Ber. Schweiz. Bot. Ges., 82, 153-158.

CLARKE E.M.W. et ELLINGER G., 1967 - J. Sc. Fd. Agric., 18, 536-640.

CLELAND R., 1968 - Plant Physiol., 43, 865-870.

- et KARLSNES A.M., 1967 - Plant Physiol., 42, 669-671.

COHN E.J. et EDSALL J.T., 1943 - In Solubulity of Amino Acids,Peptids and Related Substances in Water and Organic Solvents, 196-216, Reinhold Publishing Co., New York.

COLLET G., 1972 - Thèse, Université de Lausanne.

- DUBOUCHET J. et PILET P.E., 1964 - Physiol. vég., 2, 157-194.

COUDERT J., 1960 - In Traité de Lyophilisation, 253-259, Hermann, Paris.

COWIE D.B., 1962 - In The Amino Acid Pools, 633-645, Elsevier Publishing Co., Amsterdam.

- et WALTON B.P., 1956 - Biochim. Biophys. Acta, 21, 211-226.

DANIELSSON C.E., 1951 - Acta Chem. Scand., 5, 541-554.

DER TERROSSIAN E., KASSAB R., PRADEL L.A. et NGUYEN VAN THOAI, 1966 - Biochim. Biophys. Acta, 122, 462-469.

DIXON G.R., 1971 - Plant and Soil, 34, 531-534.

DUSTIN J.P., CZAIKOWSKA C., MOORE S. et BIGWOOD E.J., 1953 - Anal. Chim. Acta, 9, 256-262.

EDELHOCH H., 1967 - Biochem., 6, 1948-1954.

EFRON M., 1965 - In Automation in Analytical Chemistry, 637-642, Technicon Corp., Tarrytown (New York).

ERTINGHAUSEN G. et ADLER H., 1969 - J. Chromatog., 44, 620-623.

- - et REICHLER S., 1969 - J. Chromatog., 42, 355-366.

FOLKES B.F. et YEMM E.W., 1956 - Biochem. J., 62, 4-11.

- - 1958 a - Ann. Rev. Plant Physiol., 9, 245-280.

1958 b - New Phytol., 57, 106-131.

FOWDEN L., 1964 - Ann. Rev. Biochem., 33, 173-199.

- 1967 - Ann. Rev. Plant Physiol., 18, 85-106.

- 1973 - In Phytochemistry, II, 1-29, Van Nostrand Reinhold Co., New York.

FOWLER M.W., 1973 - Biochem. Biophys. Acta, 304-, 326-331.

FRICKE G., 1967 - Dissertation, Bot. Institut, Universitaet Giessen (Allemagne).

FRIES N., 1953 - Physiol. Plant., 6, 292-300.

GANGULI N.C., 1955 - Die Naturwissenschaften, 42, 18.

GEHRKE C.W., KILLINGLY J.C. et WALL L.L., 1972 - J. of the AOAC, 55, 467-480.

- WALL L.L. et ABSHEER J.S., 1973 - J. of the AOAC, 56, 1096-1105.

- - et KILLINGLY J.S., 1971 - J. of the AOAC, 54, 651-657.

GOLDSTEIN A., 1967 - Biostatistics - An Introductory Text, Mc Millen Co., New York.

GRANT N.H. et ALBURN H.E., 1967 - Arch. Biochem. Biophys., 118, 292-296.

GUTTION Y., 1964 - Physiol. vég., 2, 95-156.

HAMILTON P., 1963 - Anal. Chem., 35, 2055-2064.

- 1965 - In Automation in Analytical Chemistry, 702-707, Technicon Corp., Tarrytown (New York).

HANCOCK R., 1958 - Biochim. Biophys. Acta, 28, 402-412.

HARTIG T., 1858 - Entwicklungsgeschichte des Pflanzenkeims, Leipzig.

HARVEY B.M.R.,1974 - Doct. Dissertation, Mc Master University, Hamilton, Ontario (Canada).

- et OAKS A., 1975 - Planta (Berl.), 121, 67-74.

HEACOCK R.A., WAIN R.L. et WIGHTMAN F., 1958 - Ann. appl. Biol., 46, 352-365.

HILL R.L., 1965 - Adv. Prot. Chem., 20, 37-107.

- et SCHMIDT W.R., 1962 - J. Biol. Chem., 237, 389-396.

HILLER A. et VAN SLIJKE D.D., 1922 - J. Biol. Chem., 53, 253-267.

HIRS C.H.W., STEIN W.H. et MOORE S., 1954 - J. Biol. Chem., 211, 941-950.

HOLLEMAN J.M. et KEY J.L., 1967 - Plant Physiol., 42, 29-36.

HRDINA J., 1968 - In VI. Colloquium in Amino Acid Analysis, Technicon Monograph 3, 60-73, Technicon Internat. Division, Genève.

IGLE J., BEEVERS L. et HAGEMANN R.H., 1963 - Plant Physiol., 39, 735-740.

INGVERSEN J. et IVANKO S., 1971 - Physiol. Plant., 24, 199-204.

IUPAC-IUB (Commission on Biochemical Nomenclature), 1967 - Biochem. J., 102, 23-27.

IVANKO S. et INGVERSEN J., 1971 - Physiol. Plant., 24, 355-362.

JAKHER U.S., CHATTERJEE S.R. et DAS H.K., 1974 - Indian J. Biochem. Biophys., 11, 74-77.

JENNINGS A.C. et WATT W.B., 1967 - J. Sc. Fd. Agric., 18, 527-535.

JENSEN R., 1965 - Chromatographie sur colonne d'aminoacides:influence de

la concentration en chlorure de sodium du gradient de tampon, 1-5, In Symposium 1965, Cie. Technicon, Domont (France).

JENSEN W.A., 1955 - Exper. Cell Res., 8, 506-522.

JONES V.M. et BOULTER D., 1968 - New Phytol., 67, 925-934.

JOLLES J., VAN LEEMPUTTEN E., MOUTON A. et JOLLES P., 1972 - Biochim. Biophys. Acta, 257, 497-510.

JOTTERAND-DOLIVO M.C. et PILET P.E., 1975 - Plant Sc. Letters, 4, 183-187.

KAREL M. et FLINK J.M., 1973 - J. Agr. Food Chem., 21, 16-21.

KARLSON P., 1971 - In Biochimie (2. éd.), Doin, Paris.

KASTINGS R. et DELWICHE C.C., 1958 - Plant Physiol., 33, 350-354.

KATSUMI M., 1973 - Bot. Mag., (Tokyo), 86, 267-273.

KAUSHIK M.P. et LAL B.M., 1974 - Geobios (Jodhpur), 1, 119-122.

KELLER E. et PILET P.E., 1974 - Aminosaeurenbestimmung mit dem TSM und dem NC-1 aus Wurzeln von Linsenkeimlingen (Lens culinaris), 1-15, In VI. Technicon Symposium, Technicon GMBH, Bad Vilbl (Allemagne).

- - 1975 - C. R. Acad. Sc. Paris, 281, 635-638.

KIRKMAN M.A., 1974 - J. Chromatog., 97, 175-192.

KOEHLER D., 1968 - Planta (Berl.), 79, 50-57.

KOEHLER K.H. et BORRISS H., 1967 - In Physiologie,Oekologie und Biochemie der Keimung II, 561-577, Ernst-Moritz-Arndt-Universitaet, Greifswald (Allemagne de l'Est).

KNYPL J.S., 1967 - Flora, A, 158, 230-240.

KOHL J.G., 1971 - Biol. Zentralbl., 90, 755-767.

KOLLER D., MAYER A.M., POLJAKOFF-MAYBER A. et KLEIN S., 1962 - Ann. Rev. Plant Physiol., 13, 437-463.

KREBS H.A. et HENSELEIT K., 1932 - Z. Physiol. Chem., 210, 33-36.

KRELLE E. et LIBBERT E., 1968 - Planta (Berl.), 317-320.

KRISHNAMURTHY S., PATWARDHAN M.V. et SUBRAMANYAM H.,1971 - Phytochem., 10, 2577-2581.

KURASHI K., ABOOD L.G. et GOMBOS G., 1966 - J. Chromatog., 24, 264-267.

KUTACEK M., HOFINGER M. et KRALOVA M., 1971 - Arch. Internat. Physiol. Biochim., 79, 699-709.

LAMPORT D.T.A., 1965 - Adv. Bot. Res., 2, 151-218.

- 1970 - Ann. Rev. Plant Physiol., 21, 235-270.

- et MILLER D.H., 1971 - Plant Physiol., 48, 454 -456.

LARSON L.A. et BEEVERS H., 1965 - Plant Physiol., 38, 424-432.

LAVANCHY P., 1970 - Thèse, Université de Lausanne.

LAWRENCE J.M. et GRANT D.R., 1963 - Plant Physiol., 38, 561-566.

- DAY K.M. et STEPHENSEN J.E., 1959 - Plant Physiol., 34, 668-674.

LEACH S.J., 1953 - Rev. Pure Appl. Chem., 3, 25-60.

LEOPOLD A.C., 1961 - Science (New York), 134, 1727-1732.

LIGHT A. et SMITH E.L., 1963 - In The Proteins,Composition,Structure and Functions 2nd. ed., 1, 1-51, Academic Press, New York.

LINSKENS H.F. et SCHRAUWWEN J., 1969 - Acta Bot. Neerl., 18, 605-614.

LINSER H., RIEHLE G. et NEUMANN K.H., 1966 - Z. Acker- u. Pflanzenbau, 124, 269-282.

LONG C.L. et GEIGER J.W., 1969 - Anal. Chem., 29, 265-283.

LORENZEN H. et WEISBRICH J., 1969 - Ber. dtsch. Bot. Ges., N. F., 3, 103-116.

MAC GALE E.H.F. et IAN F., 1974 - J. Chromatog., 89, 350-354.

MAC KEE H.S., 1950 - Aust. J. Biol. Sci., B, 3, 474-486.

MAC KEE H.S., 1958 - In Handbuch der Pflanzenphysiologie, VIII, 477-553, Springer Verlag, Berlin.

MAHLER H.R. et CORDES E.H., 1971 - Biological Chemistry 2nd. ed., Harper et Row, New York.

MAIA G.A. et LUH B.S., 1970 - Confructa, 15, 216-229.

MARTIN C. et THIMANN K.V., 1972 - Plant Physiol., 49, 64-71.

MAYER A.M. et SHAIN Y., 1974 - Ann. Rev. Plant Physiol., 25, 167-193.

MAZLIAK P., 1973 - Ann. Rev. Plant Physiol., 24, 287-310.

MEYER H., MAYER A.M. et HAREL E., 1971 - Physiol. Plant., 24, 95-101.

MOHR G., ERDMANN D. et SCHNEIDER G., 1966 - In Medelingen Rijksfaculteit Landbouwwetenschapen Gent, XXXI, 1101-1105.

- - - 1967 - Morphaktine,eine neue Klasse von Wachstumsregulatoren , 1-9, In VI. Internationaler Pflanzenschutzkongress Wien, Merck Blaetter, E.Merck AG, Darmstadt (Allemagne).

MOORE S. et STEIN W.H., 1963 - In Methods in Enzymology, VI, 819-831.

MORGAN C. et REITH W.S., 1954 - J. Exptl. Bot., 5, 119-135.

MOSSE J., 1966 - Feder. Proc., 25, 1663-1669.

- et RAUDET J., 1969 - Ann. Physiol. vég., 11, 51-66.

NANDI D.L., 1958 - Die Naturwissenschaften, 45, 246.

NAUMANN L.W., 1969 - J. Chromatog., 41, 456-458.

NELSON C.J. et SMITH D., 1972 - J. Agr. Food Chem., 20, 125-128.

NGUYEN S.T. et PAQUIN R., 1971 - J. Chromatog., 61, 349-351.

NOVAKOWSKI W., 1968 - Thèse, Université de Lausanne.

OAKS A., 1963 - Biochim. Biophys. Acta, 76, 638-641.

- 1965 - Plant Physiol., 40, 142-149.

OAKS A., 1966 - Plant Physiol., 41, 173-180.

- et JOHNSON F.J., 1972 - Phytochem., 11, 3465-3471.

- MITCHELL D.J., BARNARD R.A. et JOHNSON F.J., 1970 - Can. J. Bot., 48, 2249-2258.

OOTA Y., RYOHEI F. et SYOZO O., 1953 - J. Biochem., 40, 649-661.

ORESKES I. et KUPFER S., 1967 - Anal. Chem., 39, 397-398.

OSBORNE D.J., 1962 - Plant Physiol., 37, 595-602.

OULEVAY J. et HEITEFUSS R., 1974 - J. Chromatog., 94, 283-286.

PALFI G., BITO M. et PALFI Z., 1973 - Fiziol. Rast., 20, 233-238.

PATE J.S., 1962 - Plant and Soil, 17, 333-356.

PAYNE P.M., MILTON J.M. et BOULTER D., 1965 - Studies on Amino Acid composition of Root exsudates using a Technicon AutoAnalyzer, 680-681, In Symposium Technicon London, Technicon Corp., Basingstoke (Angleterre).

PERDRIZET E., DAMERON P., GILLOT J., DOMMERGUES P. et MARTIN C., 1965 - C. R. Acad. Sc. Paris, 261, 3189-3192.

PERKINS H.J., 1962 - Can. J. Plant Sc., 41, 689-691.

PERNET J.J., 1973 - Thèse, Université de Lausanne.

PERRY T.L., STEDMAN D. et HANSEN S., 1968 - J. Chromatog., 38, 460-466.

PETERSON E.A. et SOBER H.A., 1959 - Anal. Chem., 31, 857-862.

PFEFFER W., 1876 - Landw. Jahrb. (Berl.), 5, 87-130.

PILET P.E., 1951 - Mém. Soc. vaud. Sc. nat., 10, 137-244.

- 1957 a - Actes Soc. helv. Sc. nat., 137, 90-91.

- 1957 b - Bull. Soc. vaud. Sc. nat., 66, 473-476.

- 1957 c - Physiol. Plant., 10, 708-727.

- 1959 - Bull. Soc. vaud. Sc. nat., 67, 133-138.

PILET P.E., 1960 - Bull. Soc. bot. suisse, 70, 268-296.

- 1961 a - Les Phytohormones de Croissance, Masson éd., Paris.

- 1961 b - In Handbuch der Pflanzenphysiologie, XIV, 784-806, Springer Verlag, Berlin.

- 1969 - Experientia, 25, 1036.

- 1970 - Experientia, 26, 608-609.

- 1971 - Les Parois cellulaires, Doin éd., Paris.

- 1972 a - Symp. Biol. Hung., 13, 313-323.

- 1972 b - Planta (Berl.), 106, 169-171.

- 1972 c - Physiol. vég., 10, 347-367.

- 1973 - Plant Sc. Letters, 1, 137-140.

- et BRAUN R., 1970 - Physiol. Plant., 23, 245-250.

- et KOBR M., 1958 - Bull. Soc. bot. suisse, 68, 239-248.

- - 1959 - Bull. Soc. bot. suisse, 69, 261-276.

- et MARGOT L., 1953 - Bull. Soc. vaud. Sc. nat., 65, 391-408.

- et MEYLAN S., 1953 - Bull. Soc. bot. suisse, 63, 430-466.

- et NOUGAREDE A.L., 1965 - Bull. Soc. franç. Physiol. vég., 11, 187-201.

- - 1967 - Bull. Soc. bot suisse, 77, 156-172.

- - 1974 - Plant Sc. Letters, 3, 331-334.

- et NOVAKOWSKI W., 1966 - C. R. Acad. Sc. Paris, 262, 2156-2158.

- et SIEGENTHALER P.A., 1959 - Bull. Soc. bot. suisse, 69, 58-74.

- - 1962 - C. R. Acad. Sc. Paris, 254, 340-342.

- et WENT F.W., 1956 - Amer. J. Bot., 43, 190-198.

- et ZRYD J.P., 1965 - Ann. Physiol. vég., 7, 243-250.

PRECHT H., CHRISTOPHERSEN J., HENSEL H. et LARCHER W., 1973 - Temperature and Life, Springer Verlag, Berlin.

PRESBY H.J. et FOWDEN L., 1965 - Phytochem., 4, 169-176.

PRIANISCHNIKOW I., 1922 - Ber. Bot. Ges., 40, 242-248.

PURDIE J.W., FARANT J.P. et GRAVELLE R.A., 1966 - J. Chromatog., 23, 242-247.

RAO R., MUKERIJ K.G. et RAO N.S.S., 1973 - Z. Pflanzenphysiol., 69, 84-86.

REES M.W., 1946 - Biochem. J., 40, 632-640.

REY L., 1960 - Traité de Lyophilisation, Herman, Paris.

- 1964 - Aspects Théoriques et Industriels de la Lyophilisation, Herman, Paris.

RINGE F. et VON DENFFER D., 1967 - Wiss. Ztschr. Univ. Rostock, Math.-Naturw. Reihe, 4/5, 693-697.

ROBERTS L.W. et SHANKLA N., 1973 - Plant Cell Physiol., 14, 521-530.

ROBINSON E. et BROWN R., 1952 - J. Exptl. Bot., 3, 356-374.

RYCZKOWSKI M., 1972 - Bull. Acad. polon. Sc., XX, 345-350.

SACHER J.A., TOWERS G.H.N. et DAVIES D.D., 1972 - Phytochem., 14, 2383-2391.

SACHS J., 1868 - Physiologie Végétale:Recherches sur les conditions d'existence Plantes et sur le jeu de leurs Organes, Masson et Fils, Paris.

SAIFER A., 1971 - Anal. Chem., 40, 412-423.

SANGER F., 1952 - Adv. Prot. Chem., 7, 1-67.

SCHALLER K. et WUENSCH A., 1973 - Die Nahrung, 17, 415-417.

SCHNEIDER E.A. et WIGHTMAN F., 1974 - Can. J. Biochem., 52, 698-705.

SCHNEIDER G., 1967 - Wiss. Ztschr. Univ. Rostock, Math.-Naturw. Reihe, 4/5, 699-702.

- 1969 - Ber. dtsch. Bot. Ges., N. F., 3, 19-41.

SCHNEIDER G., 1970 - Ann. Rev. Plant Physiol., 21, 499-536.

- MOHR G. et ERDMANN D., 1967 - Moeglichkeiten der Entwicklungssteuerung von Pflanzen mit Morphaktinen, 21-33, In VI. Internationaler Pflanzenschutzkongress Wien, Merck Blaetter, Merck AG, Darmstadt (Allemagne).

SCHRAMM E., DUSTIN J.P., MOORE S. et BIGWOOD E.J., 1953 - Anal. Chim. Acta, 9, 149-162.

SCHULZE E., 1906 - Landw. Jahrb. (Berl.), 35, 621-666.

SCHUPHAN W. et SCHWERDTFEGER E., 1972 - Qual. Plant Mater. Veg., 23, 141-157.

SCHWARZE P., 1958 - In Handbuch der Pflanzenphysiologie, IX, 121-135, Springer Verlag, Berlin.

SHIRAKAWA M. et OTOKARA A., 1956 - J. Agr. Chem. Soc. Japan, 30,158-163.

SIEGENTHALER P.A., 1963 - Thèse, Université de Lausanne.

SIMON E.W., 1967 - XXIst. Symposium Soc. exp. Biol., 21, 215-230.

SIMS A.P. et FOLKES B.F., 1964 - Proc. Royal Soc. (B), 159, 479-502.

SINGH T.N., PALEG L.G. et ASPINALL D., 1973 - Aust. J. Biol. Sc., 26, 45-56.

SMITH E.L., STOCKELL A. et KIMMEL J.R., 1954 - J. Biol. Chem., 207, 551-561.

SODEK L. et WILSON C.M., 1973 - Biochim. Biophys. Acta, 304, 353-362.

SPACKMAN D.H., STEIN W.H. et MOORE S., 1958 - Anal. Chem., 30, 1190-1206.

STEWARD F.C. et BIDWELL R.G.S., 1958 - J. Exptl. Bot., 9,285-305.

- - 1962 - In The Amino Acid Pools, 667-693, Elsevier Publishing Co., Amsterdam.

- et DURZAN D.J., 1965 - In Plant Physiology, IV A, 379-636, Academic Press, New York.

- LYNDON R.F. et BARBER J.T., 1965 - Amer. J. Bot., 52, 155-164.

- et POLLARD J.K., 1962 - In The Amino Acid Pools, 25-42, Elsevier Publishing Co., Amsterdam.

STEWARD F.C., THOMPSON J.F. et POLLARD J.K., 1958 - J. Exptl. Bot., IX, 1-10.

STOKES P., 1953 - Annals Bot., (new series), 17, 157-169.

STRUBE U. et FELLENBERG G., 1972 - Planta, 108, 59-66.

SYNGE R.L.M., 1964 - Metabolism, 13, 969-973.

- 1968 - Ann. Rev. Plant Physiol., 19, 113-136.

SYTNIK K.M. et VYNNYCHENKO O.M., 1973 - Ukr. Bot. Zh., 30, 21-27.

THOMPSON J.F., STEWART C.R. et MORRIS C.J., 1966 - Plant Physiol., 41, 1578-1584.

TOWER G.R., PETERS E.L. et WHERRET J.R., 1962 - J. Biol. Chem., 237, 1861-1869.

TRISTAM G.R. et SMITH R.H., 1963 - Adv. Prot. Chem., 18, 227-317.

TURNER B.L. et HARBORNE J.B., 1967 . Phytochem., 6, 863-866.

VALLEE J.C., PERDRIZET E. et MARTIN C., 1968 - Ann. Physiol. vég., 10, 237-250.

VAN DEN BOSCH H., 1974 - Ann. Rev. Biochem., 43, 243-277.

VAN SANDE M., TERHEGGEN H.G., COLOMBO J.P., LOWENTHAL A. et SCHWENK A., 1970 - Argininémie avec déficience en arginase;une nouvelle maladie métabolique du cycle de l'urée, 1-11, In Symposium, Cie. Technicon, Domont (France).

VAN STEVENINCK F.M., 1975 - Ann. Rev. Plant Physiol., 26, 237-258.

VARNER J.E., BALCE L.V. et HUANG R.C., 1963 - Plant Physiol., 38, 89-92.

VICKEREY H.B., 1956 - Plant Physiol., 31, 455-464.

VIRTANEN A.I. et MIETTINEN J.K., 1953 - Biochim. Biophys. Acta, 12, 181-187.

VON ARX E., BRUGGER M., LIERSCH M. et LINDER A., 1974 - Das Medizin. Labor, 27, 287-295.

WANG D., 1973 - In Phytochemistry, II, 61-117, Van Nostrand Reinhold Co., New York.

WANNER H., 1950 - Ber. Schweiz. Bot. Ges., 60, 404-412.

WAREING P.F. et SETH A.K., 1967 - XXst. Symposium Soc. exp. Biol., 21, 543-599.

WEBER R., 1973 - In Technical Report, 1-32, Technicon Internat. Division, Genève.

WETLAUFER D.B., 1962 - Adv. Prot. Chem., 17, 303-390.

WIAME J.M., 1958 - In Handbuch der Pflanzenphysiologie, IX, 136-148, Springer Verlag, Berlin.

WIEBE H. et KRAMER P., 1954 - Plant Physiol., 29, 342-348.

WILKINS M.B., 1969 - Physiology of Plant Growth and Development, Mc Graw-Hill Publishing Co., London.

WILLIAMS S.G., 1970 - Plant Physiol., 32, 376-381.

WITHROW R.B. et PRICE L., 1957 - Plant Physiol., 32, 244-248.

WOLF J., 1958 - In Handbuch der Pflanzenphysiologie, VI, 881-908, Springer Verlag, Berlin.

WOLLGIEHN R., 1967 - XXst. Symposium Soc. exp. Biol., 21, 231-246.

WOOLHOUSE H.W., 1967 - XXst. Symposium Soc. exp. Biol., 21, 179-214.

YON J., 1969 - Structure et Dynamique conformationnelle des Protéines, Herman, Paris.

YOUNG J.L. et YAMAMOTO M., 1973 - J. Chromatog., 78, 221-227.

- - 1973 - J. Chromatog., 78, 349-355.

ZIEGLER H., 1961 - In Handbuch der Pflanzenphysiologie, XIV, 138-173, Springer Verlag, Berlin.

- VOGT I., TREICHEL S. et STREITZ B., 1969 - Ber. dtsch. Bot. Ges., N. F., 3, 43-51.

ZRYD J.P., 1969 - Thèse, Université de Lausanne.

TABLE DES MATIERES

page

AVANT - PROPOS

TABLEAU DES ABREVIATIONS 3

INTRODUCTION 4

Le problème 4

Quelques travaux 5

CHAPITRE I - MATERIEL ET METHODES

A. Matériel biologique 8

1. Mise en culture 8

1.1. Lentille 9
1.2. Maïs 9

2. Traitement 10

3. Récolte 10

4. Conservation 10

B. Méthodes 11

1. Préparation de l'extrait 11

1.1. Le solvant d'extraction 11
1.2. Broyage et agitation 12
1.3. Concentration 13
1.4. Conservation 13

1.4.1. Extrait 13
1.4.2. Culot 14

2. Hydrolyse du culot 14

page

2.1. La solution d'hydrolyse 14
2.2. Procédé 15
2.3. Concentration et conservation 16

3. Mesures et analyses 17

3.1. Longueur et poids 17
3.2. Azote et phosphore total 17

3.2.1. Mesure entièrement automatique par le "Digesteur continu" 18

3.2.1.1. Principe de réaction 18
3.2.1.2. Jeu de tubes 19
3.2.1.3. Solutions de réactifs et d'étalons 19

3.2.2. Mesure semi-automatique par le "Block digestor" 24

3.3. Acides aminés 27

3.3.1. Généralités 27
3.3.2. Analyse des extraits 27

3.3.2.1. Description du système NC-1 modifié 27
3.3.2.2. Solutions de réactifs et d'étalons 32
3.3.2.3. Réaction à la ninhydrine 33
3.3.2.4. Calcul de la concentration d'un acide aminé 35
3.3.2.5. Identification des pics 38
3.3.2.6. Chromatogramme-étalon 41
3.3.2.7. Feuille-type de résultats 41

3.3.3. Analyse des hydrolysats 45

3.3.3.1. Brève description du système TSM 45
3.3.3.2. Calcul des concentrations 46
3.3.3.3. Chromatogramme-étalon 48

CHAPITRE II - ETUDE DE NOS CONDITIONS DE TRAVAIL

1. Extraction 50

1.1. Nombre d'extractions et leurs rendements 50
1.2. Pertes durant l'extraction 53

page

1.2.1. Mesure par addition de norleucine 53
1.2.2. Mesure par la minéralisation de racines intactes 53

1.3. Reproductibilité de l'extraction 56

2. Hydrolyse 57

2.1. Durée optimale 57
2.2. Influence du matériel glucidique 60

3. Minéralisation 62

3.1. Minéralisation par le "Digesteur continu" 62

3.1.1. Comparaison entre les résultats de la méthode manuelle, semi-automatique et automatique 62
3.1.2. Linéarité 65
3.1.3. Reproductibilité 65
3.1.4. Contamination 65

3.2. Minéralisation par le "Block digestor" 72

3.2.1. Détermination de la durée optimale d'hydrolyse 72
3.2.2. Linéarité, contamination 74
3.2.3. Reproductibilité 74

4. Chromatogrammes-type de racines de Lentille 77

4.1. Introduction 77
4.2. Chromatogramme-type des acides aminés libres 78
4.3. Chromatogramme-type des acides aminés protéiniques 91

5. Analyse par chromatographie et signification des résultats 95

5.1. Extrait 95

5.1.1. Reproductibilité du chromatogramme-étalon à 37 acides aminés 95
5.1.2. Reproductibilité des acides aminés libres de racines de Lentille (18 mm) 95

5.2. Hydrolysats 98

5.2.1. Reproductibilité du chromatogramme-étalon à 18 acides aminés 98
5.2.2. Reproductibilité des acides aminés protéiniques de racines de Lentille (18 mm) 101

page

6. Comparaison avec d'autres méthodes d'extraction 102

6.1. Introduction 102
6.2. Extraction à une solution de tampon phosphate 103
6.3. Extraction à l'acide trichloracétique 104
6.4. Extraction au mélange phénol/acide acétique/eau ... 105
6.5. Résultats et discussion 106
6.6. Conclusions 112

7. Influence de la conservation des racines 114

8. Caractéristiques spectrophotométriques de l'extrait 121

CHAPITRE III - RESULTATS ET DISCUSSION

A. Evolution du taux en acides aminés des racines de Lentille .. 124

1. Variations en fonction de la longueur des racines 124

1.1. Introduction 124
1.2. Résultats 127

1.2.1. Le poids et l'azote 127
1.2.2. Les acides aminés libres 129
1.2.3. Les acides aminés protéiniques 134
1.2.4. Bilans d'azote 138

1.3. Discussion 141

2. Gradients de racines de 18 mm 146

2.1. Introduction 146
2.2. Préparation du matériel 147
2.3. Résultats 148

2.3.1. Le poids et l'azote 148
2.3.2. Les acides aminés libres 150
2.3.3. Les acides aminés protéiniques 150
2.3.4. Bilans d'azote et comparaison avec un extrait à l'acide trichloracétique 157

2.4. Discussion 160

3. Vieillissement des racines de 18 mm 166

3.1. Introduction 166

page

3.2. Conditions expérimentales 168
3.3. Résultats 168

3.3.1. Le poids et l'azote 168
3.3.2. Les acides aminés libres 170
3.3.3. Les acides aminés protéiniques 174

3.4. Discussion 174

4. Action d'une morphactine 181

4.1. Introduction 181
4.2. Technique d'incubation 183
4.3. Résultats 183

4.3.1. L'élongation, le poids et l'azote 183
4.3.2. Les acides aminés libres 185
4.3.3. Les acides aminés protéiniques 185

4.4. Discussion 185

B. Evolution du taux en phosphore des racines de Lentille 191

1. Introduction 191

2. Résultats et discussion 192

C. Evolution du taux en acides aminés des racines de Maïs avec estimation qualitative de quelques peptides 197

1. Introduction 197

2. Techniques expérimentales 197

2.1. Récolte 197
2.2. Estimation qualitative de deux peptides 198

3. Résultats et discussion 199

3.1. Chromatogramme-type de l'extrait éthanolique 199
3.2. Le poids et l'azote 202
3.3. Les acides aminés libres et protéiniques 205
3.4. La composition des peptides extraits 208
3.5. Bilans du poids, de l'azote et des acides aminés .. 210

page

CONCLUSIONS GENERALES 212

ZUSAMMENFASSUNG 217

BIBLIOGRAPHIE 219

TABLE DES MATIERES 233